THÈSE

PRESENTEE
A L'UNIVERSITE PARIS VI
POUR OBTENIR
LE TITRE DE DOCTEUR INGENIEUR
PAR

Michèle COUDERT

Sujet de la thèse :

OBTENTION DE MUTANTS EXCRETEURS DE LYSINE CHEZ DES SOUCHES DE CORYNEBACTERIUM ASSIMILANT LES HYDROCARBURES

Soutenue le 10 mai 1973 devant la Commission d'Examen

M. P. LAFFITTE — *Président*

MM. J.C PATTE, *L. SAJUS* — *Examinateurs*

THÈSE

PRESENTEE
A L'UNIVERSITE PARIS VI
POUR OBTENIR
LE TITRE DE DOCTEUR INGENIEUR
PAR

Michèle COUDERT

Sujet de la thèse :

OBTENTION DE MUTANTS EXCRETEURS DE LYSINE CHEZ DES SOUCHES DE CORYNEBACTERIUM ASSIMILANT LES HYDROCARBURES

Soutenue le 10 mai 1973 devant la Commission d'Examen

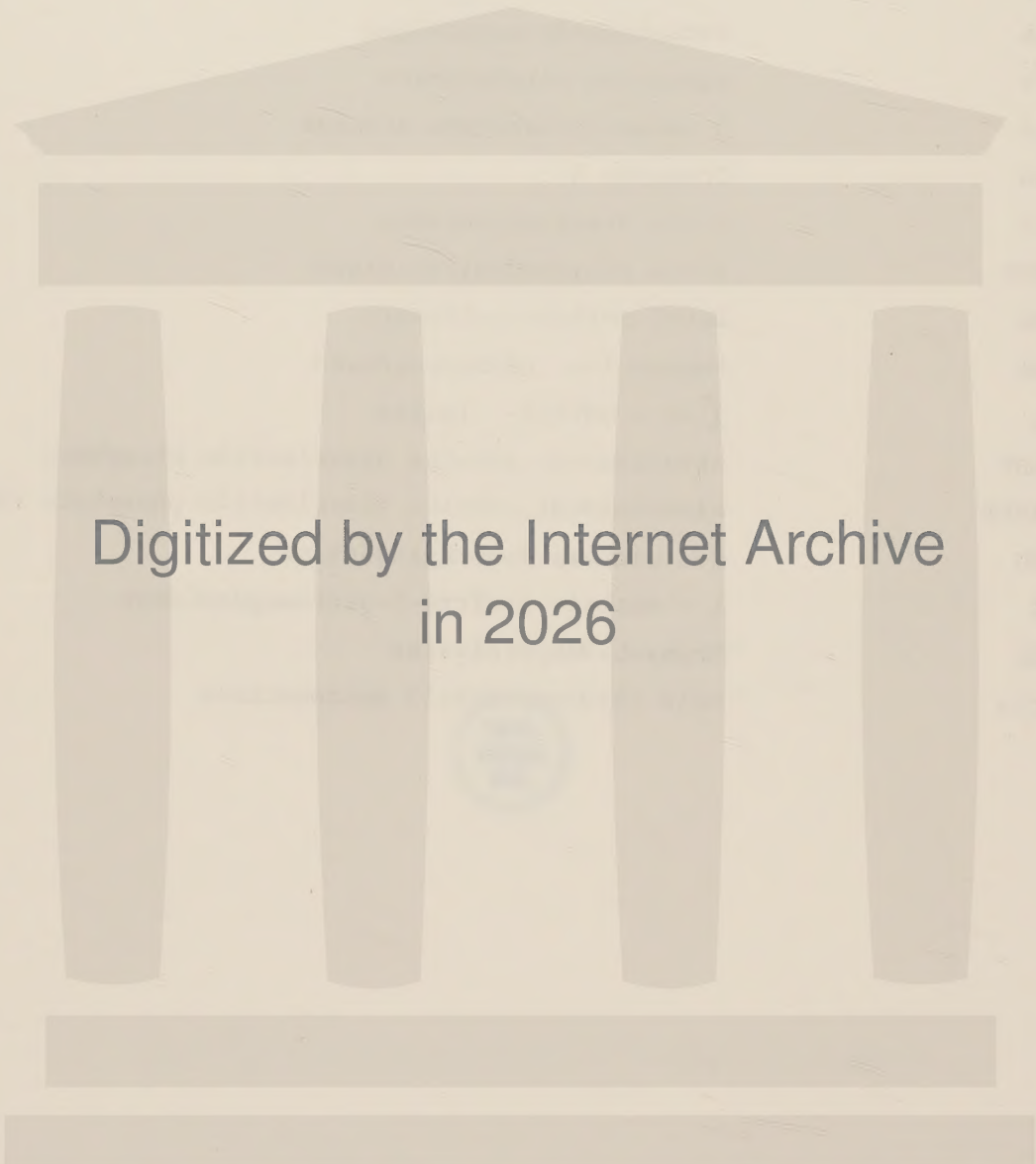
M. P. LAFFITTE — *Président*

MM. J.C PATTE, *L. SAJUS* — *Examinateurs*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ABREVIATIONS

AEC	S (β-aminoethyl) cystéine
ADP	adénosine diphosphate
ASA	semialdehyde aspartique
ATP	adénosine triphosphate
CAA	3 amino-cyclohexane alanine
CoA	Coenzyme A
DAP	acide diaminopimélique
DHDP	acide dihydrodipicolinique
EMS	éthyl méthane sulfonate
HDH	homosérine déshydrogénase
ML	ε-C - méthyl- lysine
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate réduit
NMU	N - nitroso N-méthyluréthane
NG	1 - méthyl- 3 nitro-1-nitrosoguanidine
TDL	Trans-L-déhydrolysine
Tris	tris (hydroxyméthyl) aminométhane


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543927_0015

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'accumulation d'intermédiaires biosynthétiques par des microorganismes bloqués en un point de la voie de biosynthèse considérée est un phénomène connu depuis de nombreuses années et on avait également pu établir dans certains cas que l'accumulation ne s'effectuait qu'après l'épuisement du produit terminal de la biosynthèse (85). Ce sont ces observations qui ont servi de base aux expériences qui ont mis en évidence les phénomènes de répression de la synthèse des enzymes en 1953 par Cohn, Cohen et Monod (86) et Wijesundera et Woods (87) puis de rétroinhibition de l'activité des enzymes de tête des voies biosynthétiques en 1956 par Umbarger (88) et Yates et Pardee (89). C'est peu de temps après, en 1958 que Kinoshita et ses collaborateurs décrivirent des expériences leur ayant permis d'obtenir une importante accumulation extracellulaire de lysine par des mutants auxotrophes de Corynebacterium glutamicum exigeants en méthionine et en thréonine (93). A cette époque cependant la raison des propriétés de tels mutants sélectionnés, en fait, systématiquement parmi des auxotrophes divers pour leur aptitude à excréter de la lysine, n'apparaissait pas clairement aux auteurs. Depuis, les progrès effectués dans la connaissance de la régulation du métabolisme permettent d'expliquer les propriétés de ces mutants. Elles permettent également d'envisager à priori les différents types de mutants susceptibles d'excréter un métabolite tel que la lysine que l'on peut obtenir à partir d'une souche considérée en fonction de la régulation de sa biosynthèse chez cette souche. C'est pourquoi dans ce travail qui a pour objet l'obtention et l'étude de mutants excréteurs de lysine à partir de souches bactériennes, on s'est efforcé d'étudier au préalable les facteurs susceptibles d'intervenir dans les capacités excrétrices des souches utilisées, et en premier lieu les mécanismes de régulation de la biosynthèse de cet aminoacide.

1.1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1.1. LA BIOSYNTHESE DE LA LYSINE ET SA REGULATION

La biosynthèse de la lysine par les bactéries s'inscrit en fait dans le schéma général de biosynthèse partant de l'aspartate qui conduit à quatre acides aminés : la lysine, la méthionine, la thréonine et l'isoleucine. Ce schéma de biosynthèse est détaillé sur la figure 1.1.

La régulation de cette biosynthèse ramifiée est très complexe. La principale régulation consiste en une action inhibitrice des métabolites terminaux sur l'activité des enzymes de tête des voies biosynthétiques (enzymes "clés") : l'aspartokinase, la dihydrodipicolinate synthétase, l'homosérine déshydrogénase, l'homosérine phosphate kinase et la thréonine déaminase. Certains métabolites terminaux agissent également en réprimant la biosynthèse de certaines de ces enzymes.

Selon les microorganismes, le mode de régulation des voies biosynthétiques est différent et des références générales sont données à ce sujet (1), (2), (3) et (3 bis).

ASPARTOKINASE - L'aspartokinase, première enzyme de la chaîne commune dérivant de l'aspartate, a une importance fondamentale dans le système de régulation, puisqu'elle est impliquée à la fois dans la biosynthèse des quatre acides aminés. La régulation de son fonctionnement est très complexe et diffère selon les bactéries étudiées.

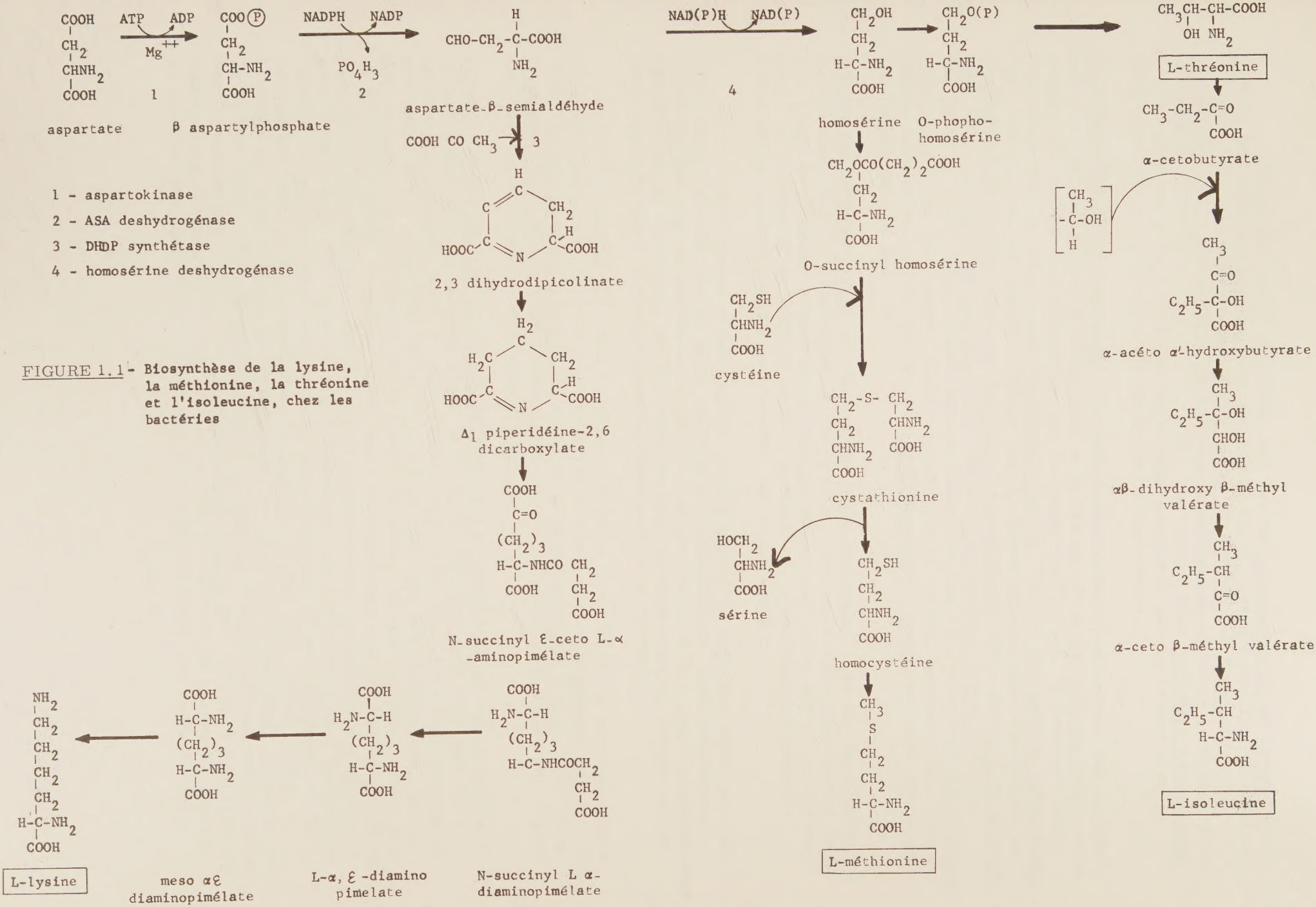
L'étude la plus complète a été menée par Cohen et collaborateurs chez Escherichia coli. En effet dès 1961 (4) ces auteurs mettaient en évidence l'existence de plusieurs aspartokinases. La suite de ces travaux a conduit à une connaissance approfondie de ce système de régulation chez E. coli (4), (25), (26). Chez cette bactérie et en règle générale chez tous les entérobactériacées il existe trois aspartokinases différentes, chacune d'elles étant inhibée et (ou) réprimée par un métabolite différent. C'est l'exemple typique de régulation par enzymes isofonctionnelles (ou isoenzymes). Chez la plupart des autres espèces bactériennes cependant, il n'existe qu'une aspartokinase soumise à une rétroinhibition concertée par la lysine plus la thréonine. Mais dans ce type général deux possibilités peuvent exister :

- La lysine ou la thréonine seules peuvent inhiber complètement l'aspartokinase, mais à des concentrations où chacune séparément a peu d'effet, leur association peut être totalement inhibitrice. C'est le cas chez Pseudomonas fluorescent (3) et chez Pseudomonas putida (5), (18).

- Au contraire, la lysine ou la thréonine seules n'inhibent pas totalement l'aspartokinase à des concentrations physiologiques, seule leur présence simultanée produit une inhibition complète. Ce type de régulation a été trouvé chez Pseudomonas acidovorans (18), (3), Rhodopseudomonas capsulatus (6), Bacillus polymixa (8).

Cependant à ces types classiques de régulation on peut ajouter certaines variantes selon les bactéries étudiées. Ainsi chez Rhodospirillum rubrum, l'inhibition concertée par la lysine plus la thréonine est levée par l'isoleucine (1). L'aspartokinase de Rhodopseudomonas spheroïdes (7) n'est inhibée par aucun des métabolites terminaux, seuls ou en combinaison. Par contre, il y a inhibition par l'aspartate semi-aldéhyde qui est un intermédiaire commun à la biosynthèse des quatre acides aminés. On retrouve cette inhibition de l'aspartokinase par l'aspartate semi-aldéhyde chez Bacillus licheniformis (9), (10). Cependant, dans ce cas, il y a aussi inhibition par la lysine et inhibition concertée par la thréonine plus la lysine.

Chez Bacillus stéarothermophilus (11), (12), il y a inhibition de l'aspartokinase par la lysine et par la thréonine ainsi qu'inhibition concertée par la combinaison des deux. Cette inhibition concertée peut être levée par plusieurs acides aminés dont l'isoleucine. De plus il existe, chez cet organisme, une seconde aspartokinase inhibée uniquement par le mésodiaminopimélate (14). Récemment Rosner et Paulus (13) ont mis en évidence chez Bacillus subtilis ces deux aspartokinases : l'une inhibée par l'action concertée de la lysine plus la thréonine et une autre inhibée par le mésodiaminopimélate. Il semble que pendant la sporulation, la première ne soit plus fonctionnelle et que la deuxième permette la fabrication de l'acide dipicolinique nécessaire aux spores.



1 - aspartokinase

2 - ASA deshydrogénase

3 - DHDP synthétase

4 - homosérine deshydrogénase

FIGURE 1.1 - **Biosynthèse de la lysine, la méthionine, la thréonine et l'isoleucine, chez les bactéries**

Plusieurs microorganismes des genres Brevibacterium et Corynebacterium, qui seront ceux utilisés dans cette thèse, ont été étudiés. Kinoshita et coll. (16) ont trouvés chez Micrococcus glutamicus (ou Corynebacterium glutamicum) une aspartokinase inhibée par l'action concertée de la lysine plus la thréonine. Shiio et coll. (17), (20), ont trouvé chez Brévibacterium flavum une aspartokinase sujette à une inhibition concertée par la lysine plus la thréonine. Cette inhibition est levée par l'isoleucine.

DIHYDRODIPICOLINATE SYNTHETASE - La dihydrodipicolinate synthètase est la première enzyme de la branche conduisant à la lysine. Chez Escherichia coli, cette enzyme est soumise à l'inhibition par la lysine (27), (34). On retrouve cette inhibition par la lysine chez Pseudomonas putida (18) et Pseudomonas acidovorans (18). Par contre, la lysine n'inhibe pas la dihydrodipicolinate synthétase de Staphylococcus auréus (28), de Bacillus licheniformis (30), de Bacillus mégatérium (31), de Bacillus subtilis (32), et de Streptococcus faecalis (33). Kinoshita et coll. n'ont trouvé aucune inhibition par la lysine chez Micrococcus glutamicus (16). Par contre, Shiio et coll., s'ils n'ont, eux non plus, trouvé aucune inhibition par la lysine chez Brevibacterium flavum, ont noté une légère inhibition par le DAP (29).

HOMOSERINE DESHYDROGENASE - L'homosérine déshydrogénase, bien que non impliquée directement dans la biosynthèse de la lysine a une importance capitale du fait que c'est la première enzyme de la branche menant aux trois autres acides aminés : la thréonine, la méthionine et l'isoleucine. D'une manière générale l'homosérine déshydrogénase est inhibée par la thréonine.

Cette enzyme a été étudiée chez Escherichia coli par Cohen et coll. (25), (26). Ils ont montré qu'il existait deux homosérine déshydrogénases, l'une inhibée par la thréonine et portée par la même protéine que l'aspartokinase inhibée par la thréonine, et une réprimée par la méthionine et portée par la même protéine que l'aspartokinase réprimée par la méthionine.

Il semble que chez les autres espèces il n'y ait qu'une homosérine déshydrogénase distincte de l'aspartokinase comme chez Pseudomonas Putida (21), (18), Pseudomonas acidovorans (18), et chez Brevibacterium flavum (23). Chez Rhodospirillum rubrum (22) l'inhibition par la thréonine est levée par l'isoleucine, la méthionine ou l'homosérine.

REPRESSION DES ENSYMES DE LA BIOSYNTHESE DE LA LYSINE - D'une façon générale il est admis que les enzymes d'une voie biosynthétique sont réprimés par le métabolite terminal, mais il faut reconnaître qu'il s'agit là d'un phénomène nettement moins connu que celui de la régulation par rétroinhibition. En ce qui concerne la biosynthèse de la lysine de plus, le problème est, comme pour la rétroinhibition, complexe étant donné le caractère ramifié des biosynthèses partant de l'aspartate. Chez E. coli l'aspartokinase I-homosérine déshydrogénase I est, comme on l'a signalé, réprimée par la thréonine plus l'isoleucine (106), l'aspartokinase II-homosérine déshydrogénase II est réprimée par la méthionine (25) et l'aspartokinase III par la lysine (4), (104), (106). L'aspartate semi-aldéhyde déshydrogénase est chez cette bactérie, réprimée par la lysine (106). Chez Rhodopseudomonas capsulatus l'aspartokinase est réprimée par la méthionine (102). Chez Brevibacterium flavum par contre, l'addition des aminoacides dérivés de l'aspartate au milieu de culture de la souche sauvage ne modifie pas l'activité spécifique de l'aspartokinase des extraits (91).

Chez le même organisme cependant, l'homosérine déshydrogénase est réprimée par la méthionine, ce qui est également le cas chez Micrococcus glutamicus (Corynebacterium glutamicum (90)

En ce qui concerne les autres enzymes de la biosynthèse de la lysine, on dispose de renseignements partiels. Chez E. coli la dihydrodipicolinate réductase et la diaminopimelate décarboxylase sont réprimées par la lysine (92), par contre, la dihydrodipicolinate synthètase n'est pas réprimée par la lysine (J.C Patte- communication personnelle). La lysine réprime aussi la dihydrodipicolinate synthètase et la diaminopimélate décarboxylase de Streptococcus faecalis (33).Chez Staphylococcus aureus, la répression partielle de la dihydrodipicolinate synthètase, de la dihydrodipicolinate réductase et de la diaminopimélate décarboxylase par la lysine a pu être mise en évidence grâce à l'utilisation de différents mutants auxotrophes exigeants en lysine (28).

Il semble, de toute façon, que les phénomènes de rétroinhibition jouent un rôle important dans la régulation des biosynthèses chez les bactéries. C'est pourquoi dans le présent travail on s'est essentiellement préoccupé du contrôle par rétroinhibition dans l'étude de la biosynthèse de la lysine.

1.1.2 DEGRADATION DE LA LYSINE

La dégradation éventuelle de la lysine par un microorganisme peut avoir, comme on le montrera dans cette étude, des conséquences importantes sur les capacités excrétrices de lysine de ce microorganisme. C'est pourquoi un aperçu des connaissances en ce domaine était nécessaire à l'exposé du travail entrepris.

Le métabolisme de la lysine chez les bactéries a été décrit par Rodwell (35). Il existe chez E. coli et B. cadaveris une lysine décarboxylase étudiée par Gale (36), (37), qui conduit à la cadavérine.

Chez Pseudomonas fluorescens et Pseudomonas putida une voie de dégradation de la lysine a été décrite passant par le Δ-aminovalérate (figure 1.2). La première enzyùe de cette dégradation est la lysine oxygénase (38), (39), (111). La seconde enzyme est la Δ-aminovaléramidase (39), (40). Par une série de réactions on passe ensuite par une transaminase(41) au glutarate semi-aldéhyde, puis au β-hydroxybutyryl CoA qui suit la voie de dégradation des acides gras en acétyl CoA (42).

Récemment, une autre voie de dégradation de la lysine passant par l'acide pipécolique a été mise en évidence chez Pseudomonas putida et Pseudomonas fluorescens (43), (109).

La lysine et la plupart des autres L-aminoacides peuvent aussi être dégradés par une L-aminoacide oxydase selon le schéma de la figure 1.3. Ce mécanisme a été décrit par Sallach et Fahien (44), Krebs (45) et Meister (46). Une L-aminoacide oxydase a été isolée dans plusieurs organismes différents, tels que les extraits de foie et de rein de mammifères ou d'oiseaux (55), (56). Bender et Krebs ont isolé chez Neurospara crassa une enzyme soluble dont l'activité est inhibée par excès de substrat (53),(54).La mieux étudiée des L-aminoacides oxydases est celle du venin de serpent (47), (48),(49),(50),(51),(52),(60), une enzyme soluble qui a été cristallisée (47) et dont l'activité est inhibée par un excès de substrat.Le rôle éventuel de cette enzyme dans la dégradation de la lysine et des autres aminoacides chez les bactéries est cependant pratiquement inconnu.

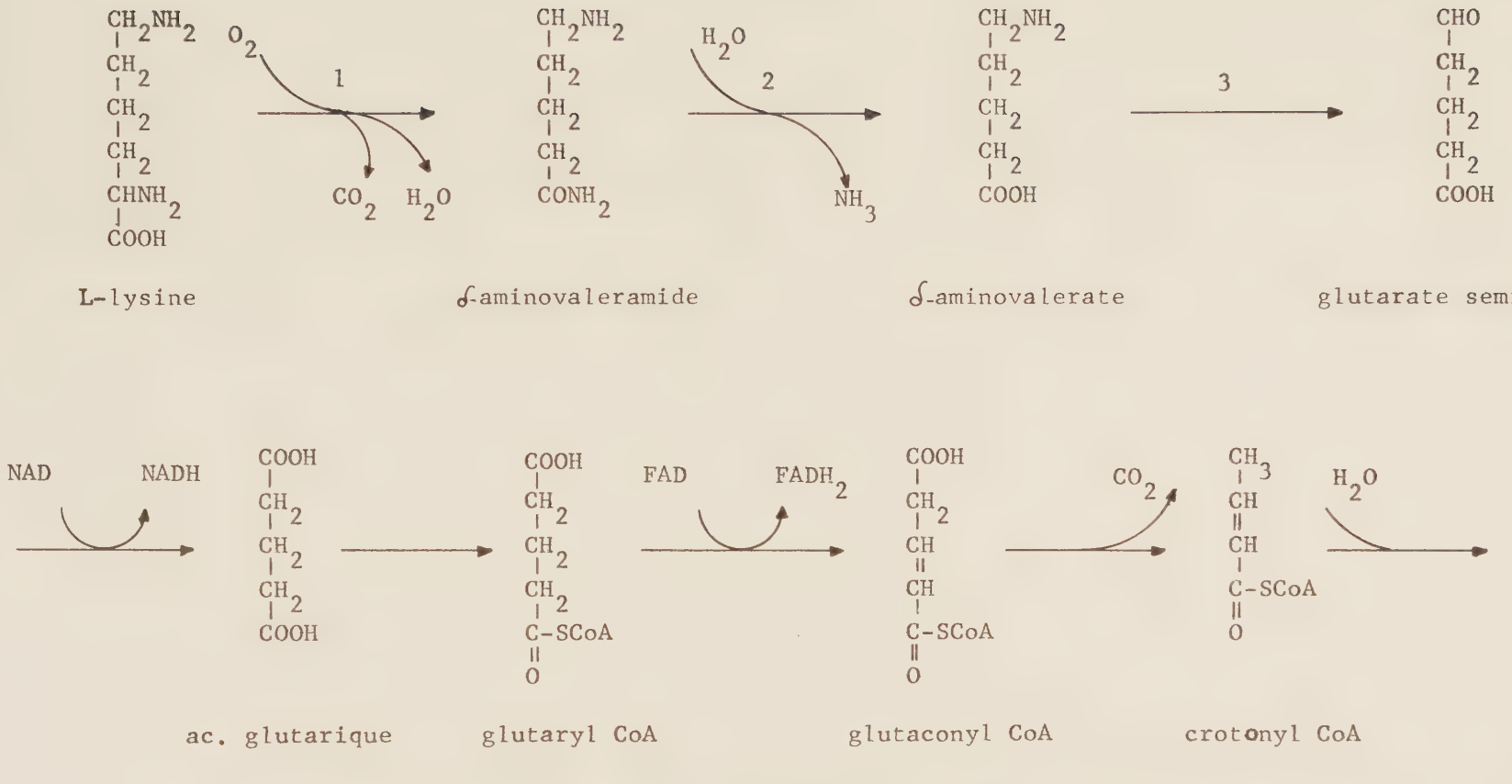


FIGURE 1.2 - Dégradation de la lysine chez P. putida et P. fluorescens passant par le δ-aminovalerate

1 - lysine oxygénase

2 - δ - aminovaléramidase
3 - δ - aminovalérate-glutamate transaminase

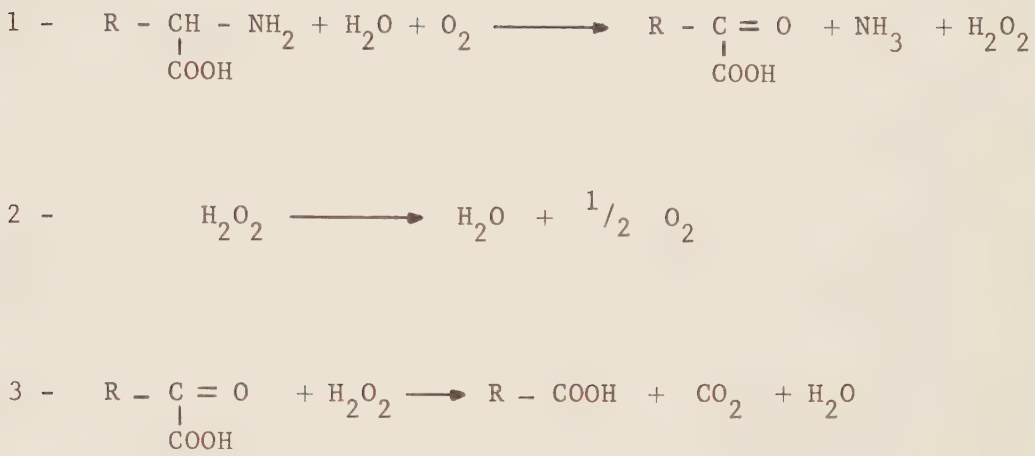


Fig. 1.3

Dégradation des L-aminoacides par une L-aminoacide oxydase

La réaction 1 est catalysée par la L-aminoacide oxydase, la réaction 2 par la catalase. La réaction 3 est non enzymatique. En présence de catalase on observe le produit des réactions 1 et 2, en son absence celui des réactions 1 et 3.

Quelques publications cependant ont démontré l'existence d'une L-aminoacide oxydase chez certaines espèces bactériennes et dans tous les cas décrits jusqu'à présent, il s'agit d'une enzyme particulaire comme chez Proteus vulgaris (57) et Proteus rettgeri (59), (60). Une activité oxydasique a aussi été décrite chez Clostridium sporogenes et Clostridium saccharobutyricum (58). Le présent travail a permis de mettre en évidence le rôle de la L-aminoacide oxydase dans la dégradation de la lysine chez les souches étudiées.

1.1.3. OBTENTION DES MUTANTS EXCRETEURS DE LYSINE. TYPES DE MUTANTS ENVISAGEABLES.

Du fait du type de régulation de la biosynthèse de la lysine observée chez la plupart des bactéries (inhibition concertée de l'aspartokinase par la lysine et la thréonine) on peut envisager d'obtenir des mutants excréteurs de deux types :

- Des mutants auxotrophes, exigeants en thréonine ou en homosérine. Chez de tels mutants cultivés en présence de quantités limitantes de thréonine, l'aspartokinase échappe, après épuisement de la thréonine du milieu, à l'inhibition par cette dernière libérant ainsi au moins partiellement la biosynthèse de la lysine. Ce sont de tels mutants qui ont été obtenus, comme on l'a déjà signalé, par Kinoshita et coll. (93), (94), (95) puis par d'autres groupes (96) avec Corynebacterium glutamicum ou d'autres espèces voisines telles que Brevibacterium flavum (97) et ont rendu possible la production industrielle de lysine par fermentation en utilisant la mélasse comme source de carbone. Des sociétés japonaises ont d'ailleurs déposé des brevets concernant des souches de mutants auxotrophes assimilant les sucres (mélasses) et excrétant de la lysine. Depuis quelques années, les mêmes sociétés japonaises travaillent avec d'autres souches de Corynebactérium assimilant les hydrocarbures. La société KYOWA a déposé en 1967 un brevet concernant des mutants exigeants en homoserine de diverses souches et notamment de Corynebacterium hydrocarboclastus (123). La même société KYOWA a décrit plus récemment et de façon nettement plus détaillée dans deux brevets (61) et (19) l'excrétion d'homosérine et de lysine par un mutant exigeant en thréonine déposé en collection (ATCC 21267). Un autre mutant exigeant en homosérine du genre Nocardia a été décrit dans un brevet (124) par la société KYOWA. Dans ces brevets, on peut rapprocher le brevet (125) déposé par la société AJINOMOTO, et concernant des mutants exigeants en homosérine ou en thréonine et utilisant l'acide acétique comme substrat des souches suivantes : Brévibactérium flavum, Brévibactérium lactofermentum, Corynebacterium acetoacidophilum et Micrococcus glutamicus.

- Des mutants de régulation. Une autre possibilité pour libérer la synthèse de la lysine du contrôle par rétroinhibition est de sélectionner des mutants dont l'aspartokinase est désensibilisée par rapport à l'inhibition par la lysine. Pour les espèces possèdant un contrôle au niveau de la dihydrodipicolinate synthétase, des mutants désensibilisés à ce niveau sont aussi à envisager. Deux méthodes sont utilisables pour l'obtention de tels mutants. La première dite des révertants d'auxotrophes consiste en un premier temps à sélectionner des auxotrophes ayant perdu l'activité de l'enzyme visé par exemple l'aspartokinase. En une seconde étape, on sélectionne parmi les révertants ceux qui n'ont pas recouvré la sensibilité à la rétroinhibition. En ce qui concerne la biosynthèse de la lysine, cette méthode a été utilisée par Cohen, Patte et leurs collaborateurs pour l'aspartokinase I de E. coli (3bis, 105) et, dans ce laboratoire par Hermann et coll. (80) pour l'aspartokinase de Pseudomonas putida.

La seconde méthode d'obtention de mutants de régulation repose sur l'emploi d'analogues de structure du métabolite considéré. Utilisée initialement par Adelberg (99) et Cohen et Adelberg (100) elle a permis à ces auteurs d'obtenir des mutants excréteurs de phénylalanine, de tyrosine et de méthionine par sélection de mutants résistants aux analogues de ces aminoacides, respectivement la thiénylalanine, la parafluorophénylalanine et la norleucine. En ce qui concerne la lysine, cette méthode a été très récemment utilisée par Sano et Shiio (101) avec Brevibacterium flavum et Hermann et coll. (80) dans ce laboratoire avec Pseudomonas. Dans les deux cas l'analogue utilisé était l'aminoéthylcystéine. On ne trouve à l'heure actuelle aucun brevet concernant des mutants excréteurs de lysine de Corynebacterium assimilant les hydrocarbures et résistants à un analogue de la lysine. Un brevet français a cependant été déposé par la société KANEGAFUCHI, concernant un mutant d'Arthrobacter alkanicus résistant à la thréonine (126). On trouve aussi un brevet anglais (127) concernant des mutants excrèteurs de lysine résistants à la S (β -aninoethyl) cysteine et utilisant comme substrat des sucres. On y mentionne la possibilité d'utiliser des souches assimilant les hydrocarbures.

1.2. PRESENTATION DU TRAVAIL

1.2.1. ORIGINE ET ETUDES PRELIMINAIRES

Les premiers travaux effectués au laboratoire dans ce domaine ont porté sur des bactéries gram-négatives du genre Pseudomonas, en particulier Pseudomonas putida. Ces travaux, menés en collaboration avec Mme Hermann, ont mis en évidence le contrôle par rétroinhibition de la biosynthèse de la lysine chez la souche utilisée P. putida T1 (18), (80), en accord avec les résultats de publications concernant cette espèce (5), (3). Ils ont également permis la démonstration chez P. putida T1 d'un système enzymatique inductible de dégradation de la lysine (18), (80), (81) dont la première enzyme est la lysine oxygénase, en accord également avec des travaux déjà publiés (38), (111). On s'est ensuite orienté vers l'obtention de mutants excréteurs de lysine avec cette souche. Notre participation à ce travail préliminaire a plus particulièrement consisté en l'obtention et en l'étude de mutants auxotrophes. On a ainsi obtenu un mutant exigeant en thréonine et en méthionine, identifié comme ayant perdu l'activité homosérine déshydrogénase. Nous avons pu montrer (80) que les extraits enzymatiques de ce mutant (T1H63) cultivé en l'absence d'inducteur étaient dépourvus d'activité lysine oxygénase lorsque la culture était faite en présence d'une quantité excédentaire de thréonine. Par contre lorsque la culture était effectuée en présence d'une quantité limitante de cet aminoacide , libérant ainsi l'aspartokinase de la rétroinhibition, les extraits obtenus contenaient une activité lysine oxygénase. Aucune excrétion de lysine n'était observée dans chacun des deux cas. Ces faits montraient clairement que d'une part, le mutant T1H63 cultivé en limitation de thréonine était effectivement capable d'une surproduction de lysine mais que d'autre part l'accumulation intracellulaire de lysine qui en résultait déclenchait l'induction du système de dégradation de la lysine, rendant impossible toute excrétion importante de lysine.

Ce phénomène d'induction endogène de la lysine oxygénase a été également observé par Mme Hermann chez d'autres types de mutants surproducteurs de lysine (mutants désinhibés) de P. putida T1 (18), (80).

1.2.2. DEFINITION DU SUJET ET PRESENTATION ADOPTEE

L'importance du problème de la dégradation de la lysine ainsi mise en évidence a orienté la suite des travaux. Le travail avec Pseudomonas a été poursuivi par Mme Hermann en utilisant soit des mutants de P. putida incapables de dégrader la lysine, soit d'autres espèces de Pseudomonas ne dégradant pas la lysine (18) (80). Le présent travail a été orienté vers d'autres types de bactéries choisies pour leur capacité d'utiliser les paraffines à cause de l'intérêt économique possible de l'utilisation de ce substrat pour la production de lysine par fermentation. Les souches choisies appartiennent au genre Corynebacterium qui a déjà fait l'objet de travaux japonais pour la production d'acide glutamique (98), (107), (110). Avant d'essayer d'obtenir des mutants producteurs de lysine, on a étudié la dégradation éventuelle de cet aminoacide par ces souches afin de pouvoir décider si elles convenaient à l'utilisation envisagée. On a ensuite tenté d'obtenir des mutants surproducteurs de deux types, mutants auxotrophes et mutants de régulation. C'est pourquoi dans l'exposé de ce travail

la présentation suivante sera adoptée. Après un chapitre consacré aux méthodes, on décrit les études de la régulation de la biosynthèse de la lysine, indispensables à l'identification ultérieure des mutants obtenus. Un autre chapitre traite ensuite des résultats concernant la dégradation de la lysine chez les souches de Corynebacterium utilisées. On décrit enfin les travaux relatifs à l'obtention et à l'étude des deux types de mutants considérés : un chapitre concerne les mutants auxotrophes tandis qu'un autre concerne les mutants de régulation.

CHAPITRE II

METHODES EXPERIMENTALES

2.1. SOUCHES

Comme on l'a déjà indiqué, le travail a principalement porté sur deux souches de Corynebacterium isolées et identifiées au laboratoire et numérotées A20 et C91 ainsi que sur une souche de collection : Corynebactérium hydrocarboclastus (ATCC 15 592) (63), (64), (65). Toutes ces souches présentent des caractéristiques analogues à celles décrites par Iizuka et Komayata sous le nom de Corynabacterium hydrocarboclastus (112). Elles excrètent sous certaines conditions (addition de pénicilline) de l'acide glutamique.

Nous avons aussi utilisé pour des travaux divers les souches suivantes :
- Pseudomonas aeruginosa 196 Aa (113)
- Pseudomonas putida T1 isolée au laboratoire (80)
- Pseudomonas acidovorans L6 isolée au laboratoire (80)
- Micrococcus glutamicus (ATCC 13058)
- Brévibacterium divaricatum (NCIB 9379) (62)
- Arthrobacter paraffineus (ATCC 21535) (66)
- Mycobacterium rhodochrous (NCIB 9784)
- Bacillus subtilis (NCIB 3610)
- Escherichia coli (NCIB 9483)
- Corynebacterium hydrocarboclastus (ATCC 21267) (61).

Enfin, pour les dosages bactériologiques de la lysine nous avons utilisé un mutant EC432 exigeant en lysine de E. coli qui nous a été donné par le laboratoire de G. Cohen (Institut Pasteur).

Les souches étaient repiquées tous les deux mois sur tubes contenant les milieux gélosés appropriés dont les compositions sont données plus loin. Les mutants auxotrophes étaient vérifiés à chaque repiquage et purifiés si nécessaire. Les mutants résistants à un inhibiteur de croissance étaient repiqués en présence de cet inhibiteur.

Les souches de collection utilisées ainsi que les souches isolées et purifiées au laboratoire ont été systématiquement lyophilisées en vue d'une longue conservation.

2.2. CULTURES BACTERIENNES

Les cultures bactériennes étaient faites pour la plupart dans des milieux minéraux simples contenant une source de carbone appropriée. Cependant on a utilisé, notamment, pour l'ensemencement des souches lyophilisées, un milieu riche, le bouillon trypticase soja (Mérieux) à raison de 30 g par litre d'eau distillée.

Les compositions des divers milieux minéraux utilisés est donnée ci-dessous. Le milieu le plus utilisé a été le milieu décrit par Robinson (67) (milieu R) utilisé pour Pseudomonas mais qui convient aussi pour les Corynebacterium, contenant par litre d'eau bidistillée :

KH_2PO_4	4 g
$Na_2HPO_4, 12 H_2O$	6 g
NH_4Cl	2 g
$MgSO_4, 7 H_2O$	0,2 g
$FeSO_4, 7 H_2O$	0,001 g
Oligo-éléments :	
$ZnSO_4, 7 H_2O$	0,1 mg
$CuSO_4, 5 H_2O$	0,1 mg
H_3BO_3	40 µg
$MnSO_4, 7 H_2O$	40 µg
MoO_3, H_2O	20 µg

Le pH était ajusté à 6,8 avec de la soude ou de la potasse normale.

On a utilisé aussi certains milieux spéciaux pour certaines souches. Ainsi la souche A20 a été cultivée sur le milieu B, contenant par litre d'eau bidistillée :

$(NH_4)_2SO_4$	20 g
KH_2PO_4	1 g
Na_2HPO_4	1 g
$MgSO_4, 7 H_2O$	0,5 g
$FeSO_4, 7 H_2O$	10 mg
$MnSO_4, H_2O$	8 mg

Le pH était ajusté à 6,8 par de la soude normale.

Le souche de collection ATCC 15592 a été cultivée sur un milieu utilisé dans le brevet de référence (61) (milieu J) contenant par litre d'eau bidistillée :

KH_2PO_4	2 g
Na_2HPO_4	2 g
$MgSO_4, 7 H_2O$	1 g
$MnSO_4, 4 H_2O$	0,05 g
$FeSO_4, 7 H_2O$	0,01 g
$ZnSO_4, 7 H_2O$	0,01 g
NH_4NO_3	10 g

Pour tester les excrétions d'aminoacides, une modification était apportée aux milieux utilisés. On ajoutait à ces derniers (ou dans certains cas au milieu R) 2 % de carbonate de calcium (61) ce qui permettait de maintenir constant le pH de la culture.

Enfin, pour la bactérie indicatrice de lysine, EC432, on a utilisé un milieu convenant à Escherichia coli, le milieu 63 contenant par litre d'eau bidistillée :

$KH_2 PO_4$	13,6 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
$MgSO_4$, 7 H_2O	0,2 g
$FeSO_4$, 7 H_2O	0,5 mg

Le pH était ramené à 7 par de la potasse normale.

Selon les souches, différentes sources de carbone ont été utilisées :

- succinate de sodium 0,05 M (Pseudomonas)
- acétate de sodium 0,05 M - pH 7 (Pseudomonas, Corynebacterium, Arthrobacter)
- glucose 1 % (Corynebacterium, Micrococcus, Brevibacterium, E. coli, Bacillus, Mycobacterium)
- hexadécane 1 à 5 % (Corynebacterium).

Les milieux et certaines sources de carbone (acétate, succinate) étaient stérilisés séparément par chauffage à 120°C pendant 20 minutes. D'autres sources de carbone (Glucose), les facteurs de croissance, vitamines ou métabolites étaient stérilisés soit par chauffage à 105°C pendant 15 minutes soit par filtration sur filtres Millipore (HAWP 02500 - 0,45 µ). Le tableau 2.1 donne les vitamines employées pour chaque souche.

TABLEAU 2.1

Facteurs de croissance utilisés pour les diverses souches.

Souches	Facteurs de croissance			
	B_1	3A	3B	Extrait levure.
E. coli	+			
Micrococcus			+	
Brevibacterium		+	+	
Bacillus subtilis				+
Corynebacterium 15592	+			

Vitamine B_1 : chlorhydrate de thiamine 1 mg/l

Vitamine 3B : biotine 10 µg/l

Vitamine 3A : panthoténate 1 mg/l
acide nicotinique 10 mg/l
mesoinositol 10 mg/l

Extrait de levure (Difco) 100 mg/l

Les cultures étaient effectuées dans des fioles d'Erlenmeyer de 150 ml (contenant 20 ml de milieu) ou de 500 ml (contenant 50 ml de milieu) placées sur des tables d'agitation à mouvement rotatif. Pour les volumes plus importants, on utilisait des fioles de Fernbach de 2 litres contenant 200 ml de milieu placées sur des appareils d'agitation à mouvement alternatif. Les cultures étaient effectuées à 30°C sauf E. coli que l'on cultivait à 37°C. Les milieux qui viennent d'être décrits ont été aussi utilisés en milieux solides gélosés en ajoutant 20 g/l de gélose.

2.3. PREPARATION DES EXTRAITS ENZYMATIQUES

Tous les extraits ont été préparés en utilisant les ultrasons. On mettait les cellules en suspension dans du tampon phosphate 20 mM à pH 7 (1 g poids humide par 2 ml de tampon) en présence de mercaptoéthanol 10 mM et de KCl 66 mM, dans le cas le plus simple. Cependant pour mesurer l'activité des enzymes de la biosynthèse de la lysine (aspartokinase, dihydrodipicolinate synthétase) et de l'homoserine déshydrogénase le tampon phosphate était additionné de 20 % de glycérol et dans certains cas d'autres protecteurs (ions ammonium, thréonine ...). La suspension était refroidie dans la glace jusqu'à 3 ou 4°C. Les cellules étaient alors cassées à l'aide d'un appareil Branson à une fréquence de 10 Kc/sec., par périodes de 10 à 20 secondes entre lesquelles on laissait à nouveau refroidir le mélange. Pour avoir un extrait contenant de 10 à 20 mg de protéines par ml avec les Corynebacterium, 12 à 15 périodes, selon le volume de la préparation, étaient nécessaires. L'extrait était alors obtenu par centrifugation à 4°C à 40 000 g pendant 45 minutes.

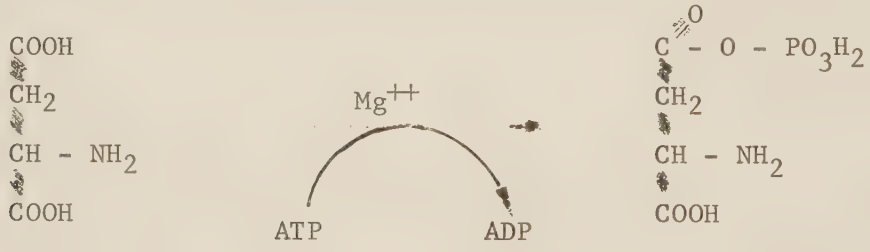
Certains extraits étaient dialysés contre un tampon phosphate 20 mM pH 7,0 contenant tous les protecteurs utilisés dans la préparation de l'extrait. Dans le cas où l'extrait était destiné à la mesure de la L-aminoacide oxydase, le tempon phosphate de la dialyse était remplacé par du tampon tris-acétate 20 mM à pH 8,0.

La mesure des activités enzymatiques était effectuée avec des extraits fraîchement préparés.

2.4. MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

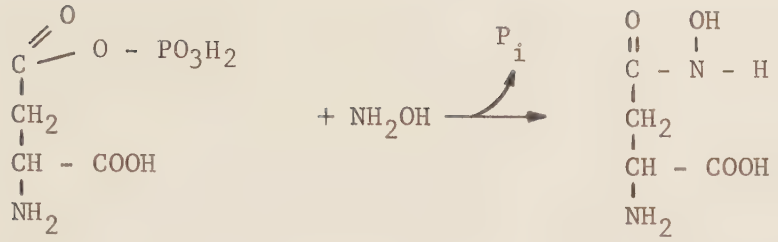
2.4.1. ASPARTOKINASE

ESSAI DIRECT : La réaction catalysée par l'aspartokinase est la suivante :



L-aspartate -aspartyl-phosphate

On a utilisé pour le mesurer la méthode de Stadtman et coll. (4) L'aspartyl-phosphate est instable au pH de la réaction (pH 8). On le transforme au fur et à mesure de sa formation en hydroxamate en effectuant la réaction en présence d'hydroxylamine.

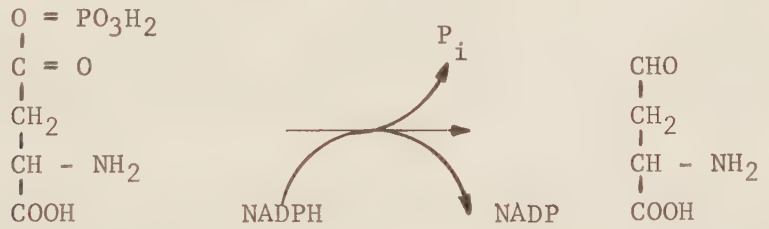


β-aspartyl-phosphate Aspartohydroxamate

Ce dernier donne avec le chlorure ferrique $FeCl_3$, en milieu acide, un complexe coloré ce qui permet de le doser par son absorption à 540 nm. Le milieu réactionnel comprenait, pour un volume total de 2,5 ml, tampon tris pH 8,0 , 40 mM, hydroxylamine 320 mM, pH 7 ; $MgSO_4$ 4 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 160 mM, acide aspartique 10 mM pH 7, ATP pH 7, 4 mM, extrait 0,1 ml (contenant de 2 à 3 mg de protéines).La réaction était déclenchée par addition de l'extrait. Un témoin était fait sans aspartate et sans ATP. On effectuait une incubation à 30°C dans un bain thermostaté. La réaction était arrêtée après 30 minutes par addition de 1 ml de $FeCl_3$. Après élimination des protéines par centrifugation, l'absorbance était lue à 540 nm. La quantité d'aspartyl hydroxamate formée était calculée à partir d'une courbe étalon établie avec du β-aspartyl-hydroxamate soumis à la même complexation par $FeCl_3$. Cette méthode a été l'objet de diverses modifications dues aux caractéristiques de cette enzyme chez Corynébacterium Ces modifications seront étudiées dans le chapitre III. L'activité spécifique était alors exprimée en μ moles de β-aspartylhydroxamate formées par minute et par mg de protéines.

La solution d'hydroxylamine était préparée par addition au dernier moment de 2 volumes égaux d'hydroxylamine 4 M et de soude 4 N. La solution de $FeCl_3$ était obtenue par addition de volumes égaux d'une solution à 5 % de $FeCl_3$ dans HCl 0,1 N, d'une solution d'acide trichloracétique à 12 % et d'acide chlorhydrique 3 N.

ESSAI COUPLE : Comme nous venons de le voir la réaction catalysée par l'aspartokinase produit le β-aspartyl-phosphate. Ce composé est alors réduit en aspartate semi-aldéhyde par l'aspartate semi-aldéhyde déshydrogénase.



β-aspartyl-phosphate aspartate semi-aldéhyde

La mesure de l'aspartokinase dans cette méthode décrite par Black et Wright (68) consiste à mesurer l'oxydation du NADPH en NADP qui résulte de l'action de l'aspartate semi-aldéhyde déshydrogénase dans un milieu réactionnel contenant un excès de cette dernière enzyme. Dans le cas présent, on a utilisé des extraits bruts contenant les deux enzymes intéressées.

Les extraits destinés à des mesures d'aspartokinase étaient préparés en présence de sulfate d'ammonium 66 mM. Le mélange réactionnel comprenait :

tampon imidazole pH 7 10 mM ; sulfate de magnésium 3,3 mM ; sulfate d'ammonium 66 mM ; aspartate pH 7 10 mM ; ATP (sel disodique) neutralisé à pH 7, 3,3 mM ; NADPH 0,13 mM, extrait : 0,1 ml (contenant de 1 à 2 mg de protéines). L'activité d'un témoin incubé sans aspartate et sans ATP était mesurée pour chaque préparation enzymatique. La courbe de formation du NADP était enregistrée directement par un spectrophomètre à 340 nm. L'activité de l'aspartokinase était alors exprimée en nanomoles de NADPH oxydées par minute et par mg de protéines.

Les mérites comparatifs de la méthode directe et de l'essai couplé seront discutés dans le chapitre III.

2.4.2. ASPARTATE SEMI-ALDEHYDE DESHYDROGENASE

Cette mesure a été faite selon la méthode de Black et Wright (79). Le milieu réactionnel comprenait : tampon diéthanolamine 167 mM pH 9, K_2HPO_4 10 mM, ASA environ 1 mM non neutralisé, NADP 0,133 mM et 0,1 ml d'extrait contenant de 2 à 3 mg de protéines. L'activité d'un témoin sans aspartate semi-aldéhyde était également déterminé. L'activité était mesurée en nanomoles de NADP réduites par minute et par mg de protéines.

2.4.3. DIHYDRODIPICOLINATE SYNTHETASE

La réaction catalysée par cette enzyme est la suivante :

aspartate semi-aldéhyde acide pyruvique acide dihydrodipicolinique

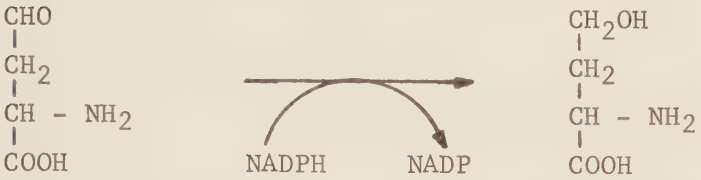
La méthode employée était celle de Yugari et Gilvarg (70) : le produit de condensation de l'aspartate semi-aldéhyde et du pyruvate présente un pic d'absorption à 270 nm lorsque la réaction est effectuée dans un tampon imidazole. Le seul problème réside dans la présence de la grande quantité de protéines dans l'extrait brut qui absorbe à 280 nm. Cette difficulté a été surmontée en effectuant des lectures différentielles dans un spectrophotomètre à double faisceau Beckman DB.

Le milieu réactionnel contenait : tampon imidazole pH 7,4 133 mM ; pyruvate 6,6 mM ; DL-aspartate semi-aldéhyde environ 1 mM non neutralisé ; 0,1 ml d'extrait brut contenait de 1 à 2 mg de protéines. La cuve de référence contenait tous les constituants sauf l'aspartate semi-aldéhyde. L'activité spécifique est donnée en ΔDO par minute et par mg de protéines.

On ne mesurait pas la pente les cinq premières minutes de la réaction : on a en effet constaté qu'il existait un temps de latence avant que la réaction enzymatique n'ait lieu. Cependant, le fait de ramener avant l'expérience l'extrait enzymatique à la température ordinaire permet de réduire ce temps de latence.

2.4.4. HOMOSERINE DESHYDROGENASE

Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



aspartate semi-aldéhyde — L-homosérine

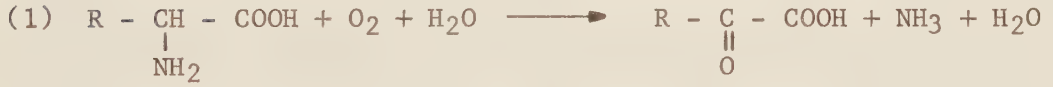
La méthode employée était celle de Black et Wright (69). L'activité était mesurée par l'oxydation du NADPH en NADP. Cette oxydation était enregistrée directement sur un spectrophotomètre à 340 nm.

Le mélange réactionnel comprenait : tampon imidazole pH 7,17 mM ; KCl 66,6 mM ; DL-aspartate semi-aldéhyde environ 1 mM non neutralisé ; NADPH 0,133 mM ; 0,1 ml d'extrait brut contenant 1 à 2 mg de protéines. Un témoin était fait sans aspartate semi-aldéhyde.

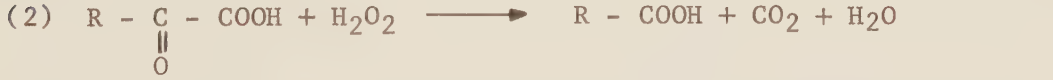
La réaction inverse est aussi mesurable mais est moins sensible que la réaction directe. Le mélange réactionnel comprenait alors : tampon diéthanol amine pH 9,25 , 133 mM ; L-homosérine 8,1 mM ; NADP 0,133 mM ; KCl 66,6 mM ; extrait brut 0,1 ml (contenant 1 à 2 mg de protéines). Le témoin était fait sans homosérine.

2.4.5. L-AMINOACIDE OXYDASE

La L-aminoacide oxydase catalyse la réaction suivante :



Puis il y a réaction non enzymatique de l'eau oxygénée sur le cetoacide :



On a déterminé cette activité par mesure de la diminution de la concentration de l'oxygène dissous dans le milieu qu'entraîne la réaction par polarographie au moyen d'une électrode à oxygène (électrode de Clark YSI 4004, Yellow Spring Instruments, USA) reliée à un enregistreur du type "graphispot" (Sefram, Paris). La mesure polarographique de l'oxygène a été décrite par Kielley (71) et Estabrook (72).

Le milieu réactionnel dans la cellule de mesure comprenait pour un volume total de 1,6 ml : tampon tris acétate pH 8,156 mM ; L-lysine 0,2 mM. Après équilibrage par agitation dans la cellule thermostatée à 25°C, on injectait à la seringue 0,1 ml d'extrait contenant de 1 à 2 mg de protéines. L'activité d'un témoin sans substrat était également déterminée.

L'étalonnage de l'appareil était fait en réduisant l'oxygène dissous dans l'eau de la cellule par du dithionite de sodium. La variation correspondante sur l'enregistreur mesurait donc la quantité d'oxygène dissoute dans l'eau à cette température.

L'activité spécifique de l'oxydase est exprimée en nanomoles d'oxygène absorbées par minute et par mg de protéines.

2.4.6. CATALASE

L'identification des oxydases nous a conduit à mesurer la catalase présente dans les extraits enzymatiques utilisés. La catalase catalyse la réaction :

$$H_2O_2 \longrightarrow H_2O + 1/2\ O_2$$

On a déterminé l'activité de la catalase par la mesure de l'apparition d'oxygène avec une électrode de Clark au moyen de l'appareillage déjà décrit. Pour éviter une saturation du tampon en oxygène et la formation de bulles, il faut travailler dans la zone de solubilité de l'oxygène dans l'eau et par conséquent utiliser un milieu réactionnel désoxygéné. On a employé un tampon phosphate 50 mM, pH 7,0 duquel on chassait l'oxygène par un barbotage d'azote.

Le milieu réactionnel comprenait donc : tampon phosphate 50 mM, pH 7, désoxygéné ; de l'eau oxygénée 2 mM (0,17 ml d'une solution 0,6 °/₀₀ de H_2O_2 dans le tampon phosphate pH 7). Après équilibrage à 25°C, on mesure l'apparition d'oxygène due à la décomposition spontanée de H_2O_2, ce qui constitue l'activité du témoin. On injecte ensuite à la seringue 0,1 ml d'extrait dilué, la dilution utilisée dépendant, bien entendu, de la catalase présente.

On a tracé une courbe de référence avec la catalase, Sigma C-10 de foie de boeuf. On a d'abord vérifié l'activité de cette dernière selon la méthode de B. Chance et A.C. Maehly (116) décrite dans le catalogue Sigma.

Dans cette méthode, on mesure la vitesse de disparition de H_2O_2 à 25°C et pH 7,0 dans un intervalle de concentration de H_2O_2 de 10,3 à 9,2 mM, en suivant la diminution d'absorbance à 240 nm. Une unité catalase dans ces conditions de mesure est la quantité d'enzyme qui décompose 1 μmole H_2O_2 par minute. La figure 2.1 montre que la mesure polarographique utilisée ici donne une réponse linéaire en fonction de la quantité d'enzyme et permet d'établir la correspondance avec la mesure spectrophotométrique.

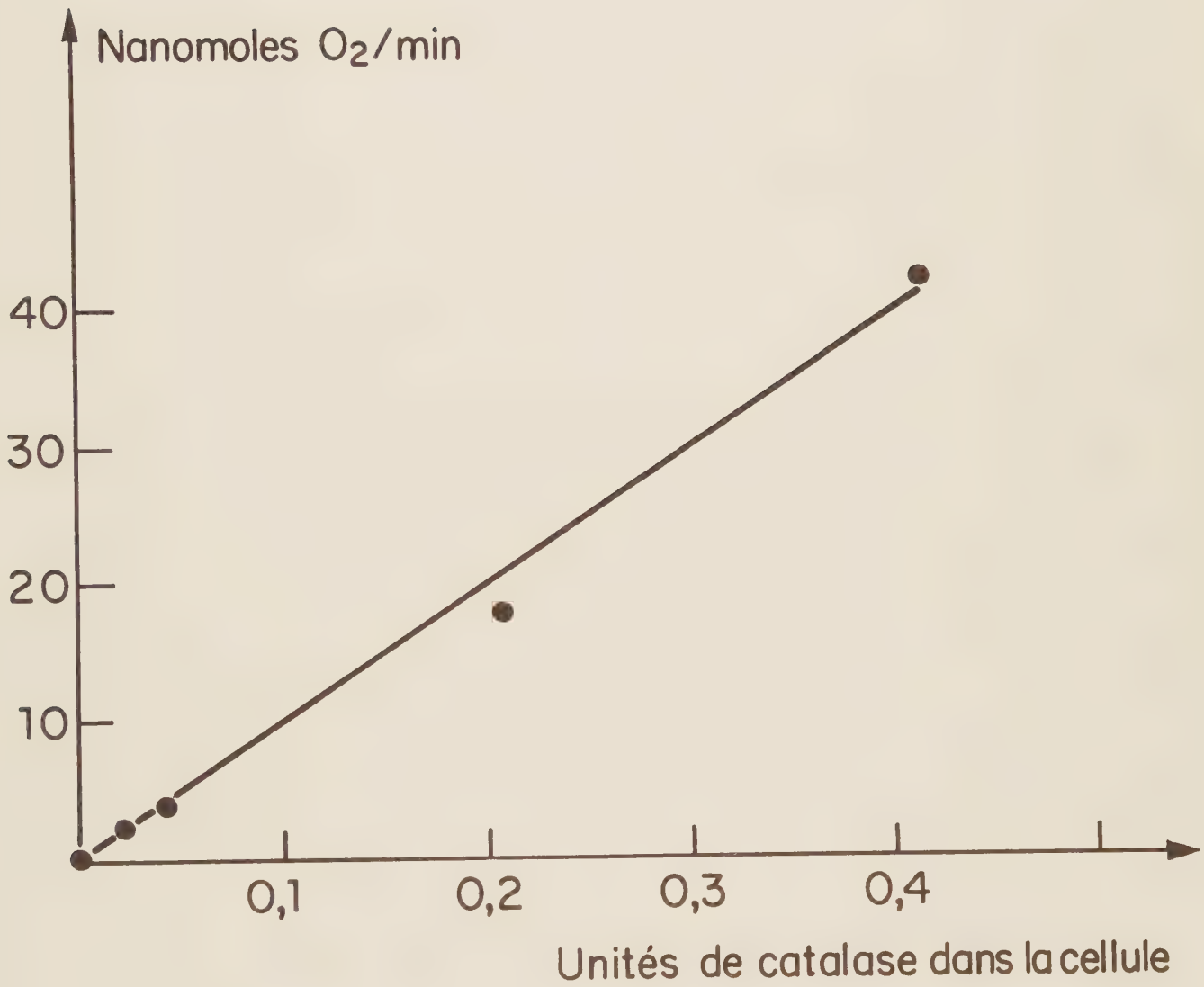


Fig. 2-1. COURBE D'ETALONNAGE POUR LA MESURE DE LA CATALASE

2.5. TECHNIQUES DE PURIFICATION ET D'ETUDE DES PROTEINES

2.5.1. PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

La méthode de précipitation au sulfate d'ammonium a été utilisée pour la purification de la L-aminoacide oxydase. Cette technique est décrite par Green et Hughes (115). Toutes les manipulations étaient effectuées à 4°C et le sulfate d'ammonium était ajouté lentement sous forme solide en agitant. On a négligé dans les calculs des concentrations les variations de volume résultant de l'addition du sulfate d'ammonium. L'agitation était maintenue pendant 30 minutes. La séparation des précipités formés était effectuée par centrifugation (30 minutes à 35 000g). Les dialyses des surnageants et des précipités étaient effectuées dans 2 litres de tampon phosphate 20 mM pH 7 additionné de 2-mercaptoéthanol 10 mM et de KCL 66 mM. Deux dialyses consécutives de deux heures avec changement de tampon étaient effectuées sur chacune des préparations pour éliminer le sulfate d'ammonium. Le tampon utilisé pour la redissolution des précipités était le même que celui utilisé pour la dialyse.

2.5.2. CHROMATOGRAPHIE

On a utilisé la chromatographie d'exclusion sur gel de Séphadex G-200 pour la purification de la L-aminoacide oxydase. Une colonne de 36 x 2,5 cm a été préparée et utilisée comme recommandé par le fabricant (Bulletins techniques Séphadex). Au sommet du gel G-200 on a déposé une couche de 5 mm de Séphadex G-25 coarse. L'échantillon contenant 20 % de sucrose était déposé lentement à l'aide d'une pompe péristaltique (0,75 ml/mn) au sommet de la colonne sous une hauteur de tampon dépassant de quelques centimètres le niveau supérieur du gel. La colonne était alors reliée à un réservoir de tampon et son débit ajusté à environ 17 ml/heure sous une pression hydrostatique d'environ 10 cm. La chromatographie était effectuée à température ambiante et des fractions, généralement de 1 ml recueillies avec un collecteur de fractions. Le volume mort de la colonne était, au préalable, déterminé à l'aide du bleu dextrane (Pharmacia). On déposait au sommet du gel 1,5 ml de bleu dextrane (2 mg/ml) dans 20 % de sucrose et on recueillait des fractions de 1 ml dont on mesurait l'absorbance à 625 nm contre une cuve témoin contenant le tampon utilisé. On a ainsi tracé la courbe d'élution du bleu dextrane (figure 2.2.) qui indique que le volume mort de la colonne utilisée est de 50 ml. On récupère environ 80 % du bleu dextrane en 14 fractions d'un ml ce qui correspond à un facteur de dilution d'environ 10.

2.5.3. DETERMINATION DES POIDS MOLECULAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

On a utilisé la méthode décrite par Andrews (73), (74) de chromatographie d'exclusion sur gel de Séphadex G-200. La colonne employée était la même que celle utilisée pour la purification de la L-aminoacide oxydase qui vient d'être décrite. On a utilisé pour la détermination du poids moléculaire de cette enzyme, une série de protéines (marqueurs) de poids moléculaires connus que l'on a chromatographiées en même temps que la L-aminoacide oxydase et on a déterminé le volume d'élution de chacune des enzymes en mesurant leur activité enzymatique

dans les fractions recueillies. Les marqueurs utilisés étaient la catalase (p. 16), l'alcool déshydrogénase (p.23) et la lactate déshydrogénase (108).

2.5.4. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

On a utilisé une technique adaptée de la méthode de Davis (114) et décrite par Hayes et Wellner (117). Dans cette méthode un seul gel était utilisé. On le préparait en utilisant les solutions suivantes : (a) Tris 1,5 M ; N, N, N', N'-tétraméthylethylène diamine 0,23 % ; pH 8,9 ajusté avec HCl (b) acrylamide 30 % ; N-N'-méthylène bisacrylamide 0,8 % et (c) persulfate d'ammonium 0,14 %. Les solutions étaient mélangées dans la proportion 1a - 1b - 2c et on laissait la polymérisation s'effectuer 20 minutes à la température ambiante. Le tampon dans lequel s'effectuait l'électrophorèse était un tampon tris (0,025 M) et glycine (0,192 M) pH 8,55. Les échantillons contenant l'enzyme, 10 % de sucrose et du bleu de bromophénol étaient déposés sur le gel à l'aide d'une seringue sous le tampon. L'électrophorèse était réalisée à 4°C jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bas du gel, en appliquant un courant de 2 mA par tube.

Les gels étaient aussitôt déposés dans un milieu révélateur fraîchement préparé et contenant : L-leucine (0,021 M) ; chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (0,35 mg par ml) ; phénazine méthosulfate (0,35 mg/ml) et tampon tris-HCl pH 7,5 (0,14 M.) La coloration se développait dans le noir à 37°C. Le temps d'incubation nécessaire pour obtenir une coloration adéquate était variable selon la quantité d'enzyme présente (de 30 minutes à plusieurs heures). Cette réaction de coloration était alors arrêtée en lavant les gels dans de l'eau glacée.

Cette méthode a été utilisée pour l'étude de la L-aminoacide oxydase.

2.6. DETERMINATIONS ANALYTIQUES

2.6.1. DOSAGE DES PROTEINES DANS LES EXTRAITS ENZYMATIQUES

Deux méthodes ont été utilisées : la méthode de Lowry (75) et la méthode du biuret (76).

METHODE DU BIURET (76) : Cette méthode simple est basée sur la formation d'un complexe en milieu basique entre le cuivre et les liaisons peptidiques donnant une couleur bleue caractéristique qui absorbe la lumière à 540 nm. Une courbe étalon est établie avec la sérumalbumine bovine.

METHODE AVEC LE REACTIF DE FOLIN (75) : Une association cuivre-protéine réduit un complexe phosphomolybdate-phosphotungstate, en donnant une solution bleue. On mesure l'absorption à 660 nm. On fait un étalonnage avec la sérumalbumine bovine. Cette méthode est plus sensible que la méthode du biuret.

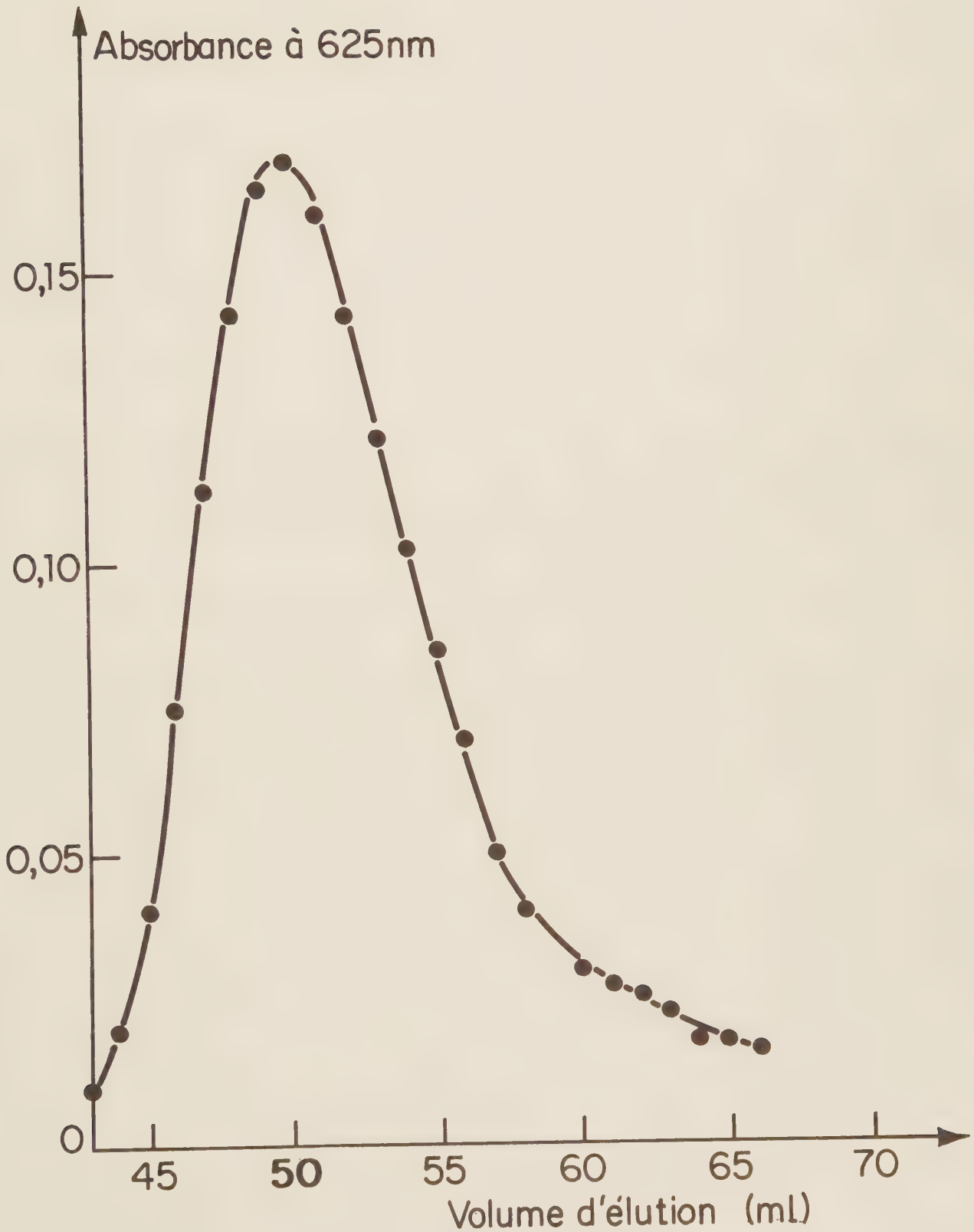


Fig. 2-2. ELUTION DU BLEU DEXTRANE SUR UNE COLONNE SEPHADEX G 200

2.6.2. DETERMINATION QUALITATIVE DE L'EXCRETION DE LYSINE

La mise en évidence qualitative d'une excrétion de lysine a été faite sur boîte de Pétri à l'aide de bactéries dites "indicatrices de lysine" ayant besoin de lysine pour leur croissance. On ensemençait une boîte de Pétri sur un petit carré de 1/2 cm de côté avec le mutant à tester (milieu et substrat spécifiques du mutant). Cette boîte était mise à 28°C pendant 48 heures.

On prenait une deuxième boîte contenant milieu 63, glucose, thiamine, (pour la bactérie indicatrice EC432) substrat et facteurs de croissance, spécifiques du mutant. On étalait 2 gouttes d'une suspension de la souche EC432 en croissance et on laissait sécher la boîte 2 à 3 heures. Une réplique était alors faite sur velours de la première boîte sur la deuxième. On mettait à 28°C pour permettre au mutant de se développer puis on transportait la boîte à 37°C pour la croissance des Escherichia coli. Si le mutant étudié excrétait de la lysine, il se développait une auréole de bactéries indicatrices autour du mutant.

2.6.3. DOSAGE DE LA LYSINE EXCRETEE PAR DES MUTANTS DANS LES MILIEUX DE CULTURE

PREPARATION DES ECHANTILLONS : Les cultures du mutant à étudier étaient faites dans des fioles de Fernbach, dans un milieu approprié additionné d'une source de carbone et des facteurs de croissance. Des prises étaient faites régulièrement. Ces prises étaient centrifugées 10 minutes à 12 000 g pour les débarasser des cellules, puis stérilisées par filtration sur filtre Millipore HAWP 02500 - 0,45 µ.

Dans ces échantillons on pouvait doser la lysine par deux méthodes : un dosage bactériologique ou un dosage spectrophotométrique.

DOSAGE BACTERIOLOGIQUE : La lysine excrétée dans le milieu de culture peut être dosée à l'aide d'une bactérie nécessitant de la lysine pour sa croissance. Suivant la quantité de lysine ajoutée au milieu de culture, la concentration finale de cellules est plus ou moins importante. Cette concentration de cellules peut être suivie dans le milieu pendant la croissance par la mesure de l'absorbance de la suspension bactérienne. Le dosage a été fait dans des fioles de 100 ml contenant : 17,6 ml de milieu 63 ; 0,2 ml de glucose 20 % ; 0,2 ml de thiamine (0,1 mg/ml) ; 2 ml d'échantillon. On ensemence avec une suspension bactérienne de EC432 dans du milieu 63. On met les fioles à pousser à 37°C sur une secouette rotative. On suit la croissance en mesurant l'absorbance de la culture à 550 nm. Une courbe d'étalonnage est établie avec des solutions connues de L-lysine en même temps que chaque dosage, bien qu'en fait les mesures soient reproductibles. Ceci permet de s'assurer que dans le témoin sans lysine il n'y a aucune croissance de la bactérie indicatrice (cette croissance pourrait être due à des révertants). A titre d'exemple on a tracé les courbes de croissance de EC432 en fonction de la quantité de L-lysine présente dans le milieu et la courbe d'étalonnage correspondante (figures 2.3. et 2.4). La quantité de lysine est alors limitante de la croissance pour des concentrations de lysine comprises entre 10^{-3} et 2×10^{-1} µ moles/ml de L-lysine. En réalité, on remarque que la courbe d'étalonnage n'est pas linéaire. Il faudrait, en toute rigueur, travailler sur des concentrations de lysine beaucoup plus faibles, ce qui donnerait bien entendu des absorbances plus faibles mais une courbe linéaire. Cette précision nous était difficile à obtenir dans les conditions utilisées (fioles munies de tubes latéraux non calibrés pour la mesure des absorbances). Cependant, la méthode employée comme décrite nous permettait un dosage de la lysine suffisant pour un dosage préliminaire approximatif.

DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE (77) : Le principe de ce dosage est que la lysine donne une réaction colorée avec la ninhydrine en présence d'acides, de même que le diaminopimélate. Cependant les spectres des produits obtenus avec la lysine et avec le diaminopimélate changent avec l'addition d'acide phosphorique 15 M comme diluant et à 515 nm l'absorption du diaminopimélate est négligeable devant celle de la lysine.

Dans les tubes de mesure on mettait 0,6 ml soit d'une solution aqueuse contenant une quantité déterminée de lysine pour tracer une courbe d'étalonnage, soit d'une solution échantillon à doser, 0,4 ml d'HCl 3 M et 1 ml d'une solution 0,84 M de ninhydrine dans le 2-métoxyéthanol. Les tubes recouverts de papier d'aluminium étaient placés dans un bain-marie d'eau bouillante pendant 60 minutes puis refroidis à la température de la pièce. On ajoutait alors 4 ml d'acide phosphorique 15 M. Après agitation, on lisait l'absorbance des solutions à 515 nm. On traçait une courbe d'étalonnage avec une solution de lysine HCl (figure 2.5).

La méthode mise au point pour le dosage de la lysine en présence de diaminopimélate s'est révélée d'un grand intérêt à cause de sa spécificité pour la lysine. En effet, seuls l'ornithine et la proline donnent des spectres similaires à celui donné par la lysine, les autres acides aminés donnant peu ou pas de coloration.

2.6.4. DOSAGE DES ACIDES AMINES

Le dosage de l'homosérine, de la lysine et d'autres acides aminés peut être fait avec un analyseur d'aminoacides.

Les prises effectuées dans les cultures après préparation comme indiqué ci-dessus (p. 19) étaient amenées à pH basique (pH 11) puis évaporées et lavées à l'eau distillée à 40°C dans un appareil Buchi (afin d'éliminer l'ammoniaque). Elles étaient ensuite reprises soit dans un tampon citrate pH 2,2, soit dans une solution d'HCl 0,01 N et analysées au moyen d'un analyseur d'aminoacides (Jeol ou Carlo-Erba).

2.7. OBTENTION DE MUTANTS

On a essayé d'obtenir deux sortes de mutants : des mutants auxotrophes et des mutants résistants à des analogues d'acides aminés.

2.7.1. MUTANTS AUXOTROPHES

Les mutants auxotrophes peuvent être soit des mutants naturels, soit des mutants obtenus en faisant agir sur les souches un agent mutagène. Dans les deux cas la méthode classique consiste à sélectionner (cribler) ces mutants en faisant agir un antibiotique comme la pénicilline par exemple dans des conditions telles que l'antibiotique tue la souche sauvage et que la proportion

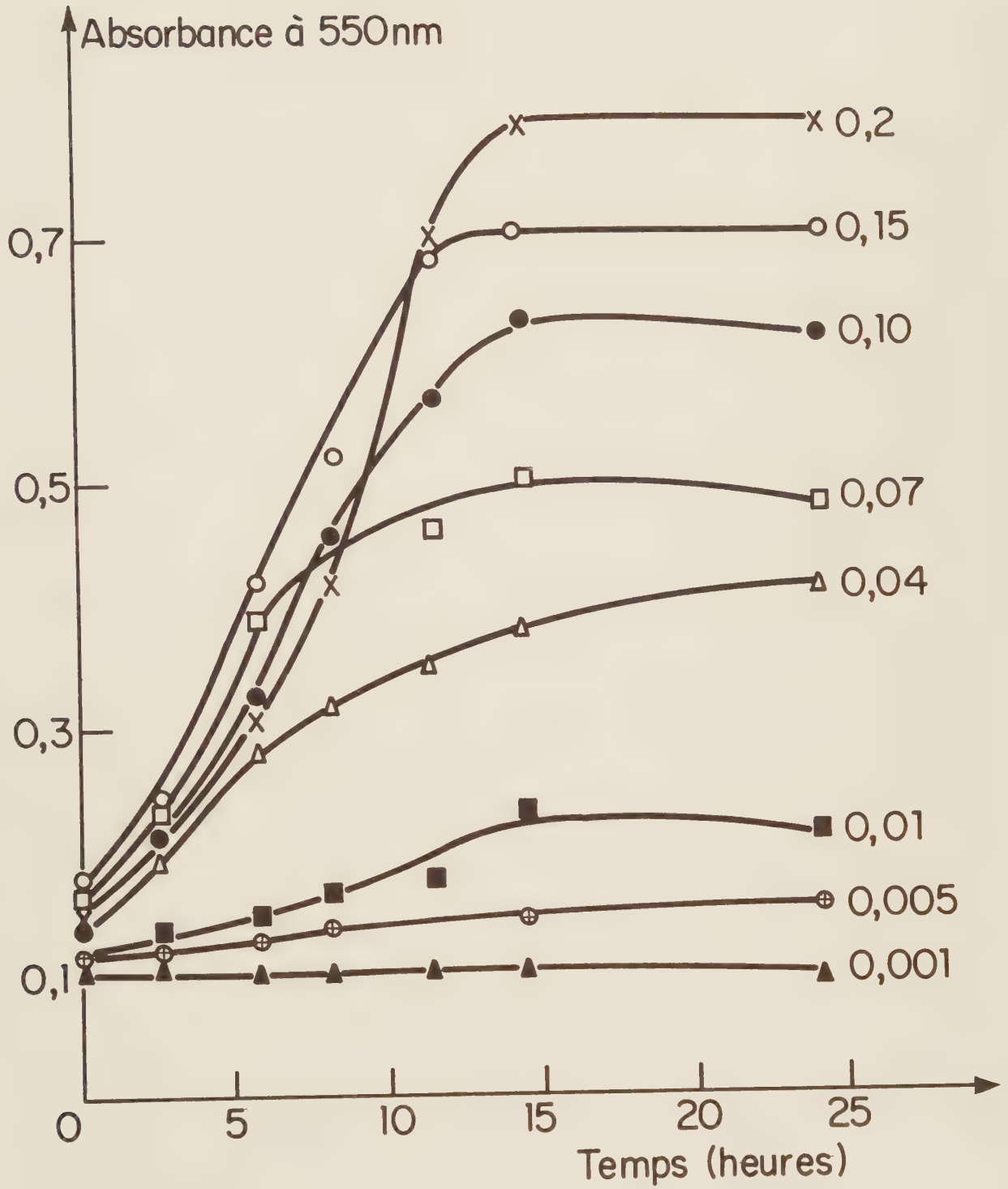


Fig. 2-3. CROISSANCE DE E. COLI 432 EN FONCTION DE LA QUANTITE DE L-LYSINE PRESENTE DANS LE MILIEU (INDIQUEE EN FACE DE CHAQUE COURBE EN μ moles/ml)

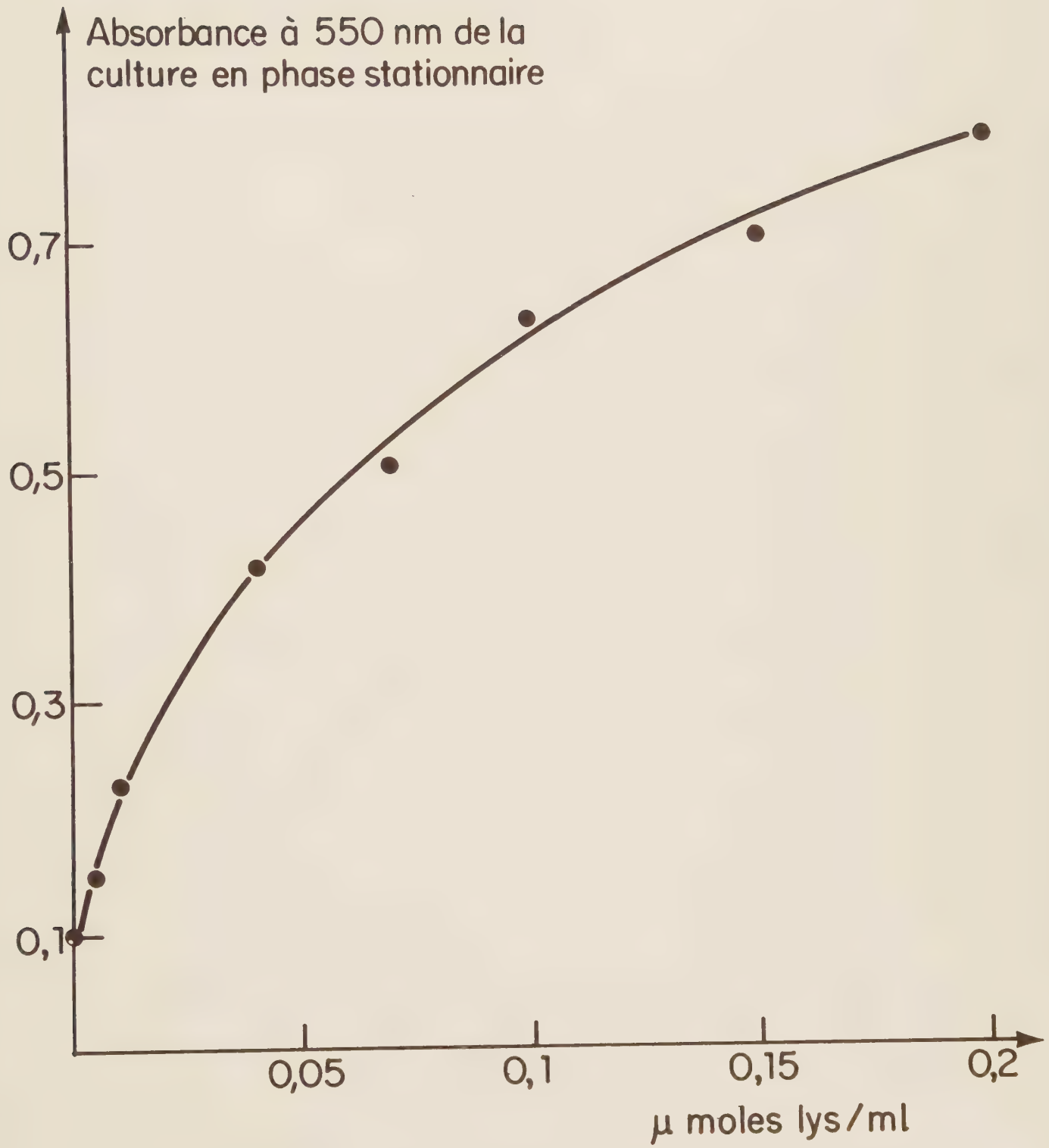


Fig. 2-4. COURBE D'ETALONNAGE POUR LE DOSAGE BACTERIOLOGIQUE DE LA LYSINE PAR EC 432

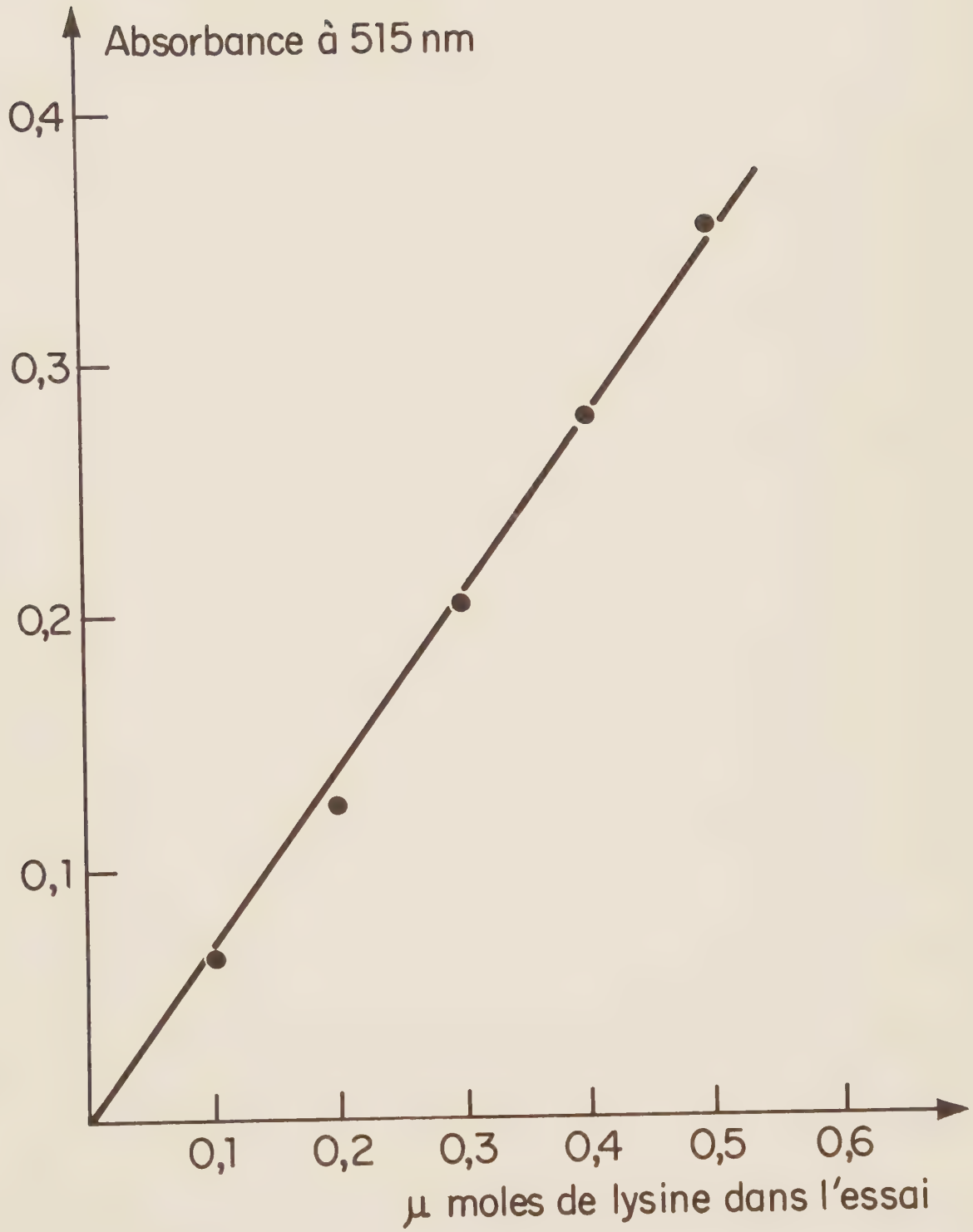


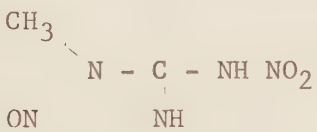
Fig. 2-5. COURBE D'ETALONNAGE POUR LE DOSAGE COLORIMETRIQUE DE LA LYSINE

de mutants dans la population augmente de telle sorte qu'ils soient facilement isolables. Les souches de Corynebacterium utilisées semblent très sensibles à la pénicilline dans la mesure où de très faibles concentrations de cet antibiotique arrêtent sa croissance. Ainsi 10 U/ml de pénicilline G ajoutées à une culture de C91 en croissance arrêtent cette croissance (l'absorbance de la culture reste constante après l'addition de la pénicilline). Mais en réalité, la mortalité due à la pénicilline reste très faible même lorsqu'on augmente de façon considérable les concentrations utilisées ou lorsqu'on associe à la pénicilline un autre antibiotique la D-cyclosérine selon une méthode appliquée aux Pseudomonas (78). Ainsi l'addition à une culture en croissance de C91 de 10^4 U/ml de pénicilline G plus 1 mg/ml de D-cyclosérine arrêtent la croissance de cette souche. Mais la mortalité obtenue au bout de 2 heures est de 90 % alors qu'elle est de 99,9 % lorsque la méthode est appliquée à Pseudomonas. Pour sélectionner les mutants il aurait fallu faire agir les antibiotiques de façon répétée et il est à craindre que nous aurions ainsi isolé des mutants résistants à ces antibiotiques. C'est pourquoi il nous a fallu pour isoler des mutants, procéder sans crible et par conséquent faire un nombre d'étalements considérable.

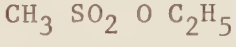
Plusieurs agents mutagènes ont donc été testés sur les Corynebacterium. On a essayé des agents chimiques :

le N-nitroso-N-méthyl uréthane (NMU)

le 1-méthyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (NG)



le éthyl méthane sulfonate (EMS)



On a aussi utilisé les radiations ultra-violettes.

Avec tous ces agents, des courbes de mortalité ont été tracées. Puis, en choisissant des conditions de mortalités adéquates on a essayé d'obtenir des mutants

Avec les souches A20, ATCC 15592, et C91 des mutants ont été obtenus en utilisant le NMU dans les conditions suivantes :

On ajoutait à une culture en croissance, une solution 1/1000 (v/v) de NMU en quantité suffisante pour que la concentration finale en NMU soit de 1/10.000 (v/v). On laissait agir le NMU à 30°C en agitant pendant 135 minutes pour A20, 150 minutes pour ATCC 15592 et 90 minutes pour C91. Ce traitement donnait entre 0,1 et 1 % de survivants. Au bout du temps fixé, les cellules étaient centrifugées et lavées plusieurs fois avec du milieu R. Puis les cellules étaient remises à pousser dans un milieu R additionné de substrat et de facteurs de croissance nécessaires aux mutants recherchés (expression de la mutation). Lorsque cette culture avait poussé, on étalait sur boîte de Pétri contenant les

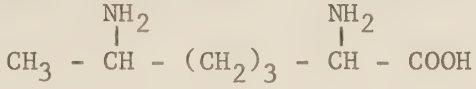
facteurs de croissance nécessaires aux mutants en utilisant des dilutions appropriées pour avoir entre 100 et 200 colonies par boîte et on repérait les mutants par répliques sur boîtes de Pétri ne contenant pas les facteurs de croissance. Les mutants étaient repiqués sur boîtes puis vérifiés en ensemençant à partir d'une seule colonie isolée des tubes avec et sans les facteurs de croissance.

2.7.2. MUTANTS RESISTANTS A DES ANALOGUES D'ACIDES AMINES

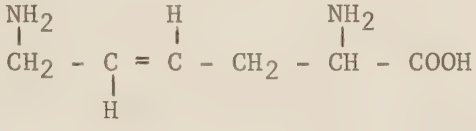
On a utilisé différents analogues de la lysine :

la S (β-aminoéthyl) cystéine (AEC)

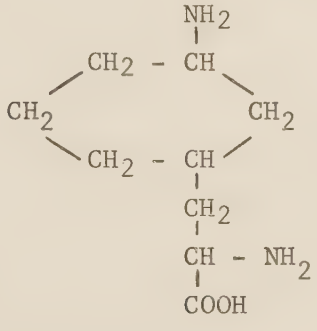
l'acide 2,6-diaminoheptanoïque ou ε.C-méthyl-lysine :



la trans-4-déhydrolysine



le 3-amino-cyclohexane alanine



On préparait des boites de Pétri contenant du milieu R dont la source d'azote était un nitrate, une source de carbone et des concentrations d'analogues compris entre 10^{-2} M et 1 M. On ajoutait aussi dans certains cas de la thréonine 1 mM et de la méthionine 1 mM.

On étalait sur ces boîtes 1 ml de suspension bactérienne (environ 10^8 bactéries/ml) en l'incorporant à 2 ml de gélose molle (7,5 g de gélose par litre de milieu).

Les mutants résistants se développaient en colonies. Ces colonies étaient repiquées sur tube contenant l'analogue utilisé.

2.8. PRODUITS CHIMIQUES

Les produits utilisés étaient d'origine commerciale principalement Sigma, mais aussi Boehringer et Fluka. L'aspartate semialdéhyde a été préparée au laboratoire selon la méthode de Black et Wright (79). La solution obtenue était conservée à - 18°C et diluée au 1/100 sans neutralisation (après vérification de l'inutilité de cette neutralisation) juste avant l'utilisation.

ANALOGUES DE LA LYSINE : L'aminoéthyl cystéine a été fournie par Gallard-Schlesinger. Le 3-aminocyclohexyl alanine, la trans-4- déhydrolysine et l'ε-C-méthyl lysine ont été synthétisées à l'Ecole de Chimie de Mulhouse (M. Fleury).

ENZYMES : Les enzymes et les protéines suivantes ont été utilisées :
- Sérum albumine bovine - Fraction V Sigma
- Catalase Sigma stock n°C10 "purified powder"
- Alcool déshydrogénase de levure deux fois cristallisée Sigma stock N°340-26
- Lactate déshydrogénase de muscle de lapin Boehringer N° 15371 ELAC
- L-aminoacide oxydase de venin de Crotalus adamanteus Sigma type IV N° A9378
- L-aminoacide oxydase de Crotalus terr. terr. Boehringer N° 15051EAAH.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DE LA LYSINE ET DE SA REGULATION

Cette étude de la biosynthèse de la lysine a été entreprise dans le but général de vérifier que nous retrouvions chez trois souches de Corynebacterium la voie de biosynthèse commune à toutes les bactéries, et en particulier de comparer les caractéristiques de sa régulation à celles d'autres espèces bactériennes, notamment celles du genre Corynebacterium décrites dans la littérature (16). Cette étude était nécessaire aussi bien pour obtenir des mutants auxotrophes que des mutants de régulation. Nous avons donc étudié succinctement l'aspartokinase et la dihydrodipicolinate synthètase de ces bactéries. Nous avons aussi mesuré l'homosérine déshydrogénase dans le but de caractériser d'éventuels mutants homosérine moins par l'absence de cette enzyme.

Il s'est avéré que ces trois souches étaient très proches les unes des autres. La majorité des essais a donc été effectuée avec la souche C91. Seuls des points comparatifs ont été faits avec la souche A20 et avec la souche ATCC 15592. Les résultats donnés sont donc les résultats des essais de la souche C91, sauf quand il est précisé dans le texte qu'il s'agit d'une des deux autres souches.

3.1. ASPARTOKINASE

3.1.1. ESSAIS PRELIMINAIRES

Nous avons tenté lors de premiers essais de mesurer l'aspartokinase par la méthode directe de Stadtman et coll. (4)

Nous avons été gênés tout d'abord par l'apparition d'une coloration rouge parasite en présence d'ATP dans l'extrait brut dialysé incubé en l'absence d'aspartate qui en réalité était due à l'utilisation d'un tampon tris-acétate. On peut supposer que la présence d'une acétate kinase dans l'extrait brut transformait l'acétate en acétyl phosphate et était la cause de cette coloration.

La méthode de Stadtman et coll. appliquée telle que décrite au chapitre 2 ne nous a pas permis de mettre en évidence une activité aspartokinase. Pour mesurer cette activité, il nous a fallu apporter un certain nombre de modifications. En particulier, nous avons dû ajouter au mélange réactionnel du mercaptoéthanol (10 mM) et du glycérol (10%). En effet, nous avons mis en évidence que des protecteurs, tels que le mercaptoéthanol et le glycérol (ou mannitol) étaient nécessaires à l'aspartokinase de Corynebacterium. De plus, nous avons ajouté aussi un système générateur d'ATP : phosphoénol-pyruvate (10 mM) et pyruvate kinase (250 µg). Ces conditions nous ont permis de mesurer l'activité aspartokinase. Cependant, en traçant la courbe d'activité en fonction du temps, on s'aperçoit que cette courbe n'est linéaire que très peu de temps (10 minutes), ce qui pourrait être dû à la grande instabilité de l'aspartokinase chez ces souches. De plus, l'activité spécifique de cette enzyme est faible. Toutes ces raisons ont fait que la méthode directe devenait d'utilisation délicate.

L'essai couplé est plus sensible que la méthode directe. De plus, on mesure l'activité aspartokinase en continu pendant des temps très courts. Cependant, comme on mesure en réalité l'oxydation du NADPH au cours de la deuxième réaction on pouvait craindre que l'ASA formé ne soit transformé par l'homosérine déshydrogénase en homosérine en consommant du NADPH. En réalité, il n'en est rien dans le cas des Corynebacterium puisque nous verrons au cours de ce chapitre que l'aspartokinase est mesurée en présence d'ions ammonium, alors que l'homosérine déshydrogénase a un besoin absolu en ions potassium. Il reste que, en toute rigueur, l'essai couplé devrait être réalisé en présence d'un excès d'ASA déshydrogénase.

En effet, l'utilisation de la méthode de l'essai couplé suppose que l'aspartate semi-aldéhyde déshydrogénase ne soit pas limitante dans les extraits étudiés. La démonstration directe de ce fait dans les extraits bruts utilisés était difficilement réalisable puisque l'aspartate semi-aldéhyde déshydrogénase n'est pas mesurée dans le sens physiologique. Nous avons malgré tout mesuré l'activité de cette enzyme et vérifié que l'aspartate semi-aldéhyde déshydrogénase n'était pas sensible à la rétro-inhibition par la thréonine et la lysine. Nous avons mesuré dans un extrait préparé dans les mêmes conditions que pour la mesure d'aspartokinase, l'aspartate semi-aldéhyde déshydrogénase selon la méthode de la page 14. L'activité était linéaire, facilement mesurable et ne nécessitait l'apport d'aucun ion métallique. (Activité spécifique 8,6 nanomoles $\times mn^{-1} \times mg^{-1}$ protéines). De plus la présence dans l'essai de thréonine 10 mM ou de l'association thréonine 10 mM plus lysine 10 mM ne changerait rien à l'activité. Autrement dit la thréonine seule ou en association avec la lysine n'inhibe pas l'aspartate semi-aldéhyde déshydrogénase.

Nous avons aussi pour la mesure de l'aspartokinase comparé les résultats donnés par les deux méthodes*. Nous avons obtenu la même activité spécifique que la mesure soit faite par la méthode directe ou par l'essai couplé. De plus, les mêmes concentrations de thréonine ou de thréonine plus lysine donnent dans les deux cas les mêmes pourcentages d'inhibition de l'activité.

Ces résultats préliminaires nous ont conduit à utiliser dans toute cette étude la méthode de l'essai couplé pour mesurer l'activité aspartokinase.

* Dans le cas de la méthode directe, les conditions d'incubation étaient celles indiquées plus haut (présence de mercaptoétanol, de glycérol, d'un système générateur d'ATP; temps d'incubation 10 minutes).

Les extraits ont été préparés dans un tampon phosphate pH 7, 20 mM contenant 20 % de glycérol en présence de 66 mM de KCl, 66 mM de $(NH_4)_2SO_4$ et de 10 mM de mercaptoéthanol.

Dans les extraits préparés sans glycérol, il était possible de mesurer une activité aspartokinase dans les heures qui suivaient la préparation de l'extrait. Mais cette activité diminuait rapidement au cours des heures et on observait une perte de 90 % de l'activité en 20 heures. De même un extrait préparé avec du glycérol et dialysé dans un tampon phosphate contenant tous les protecteurs sauf le glycérol perdait 70 % de son activité au cours d'une dialyse de deux heures. Par contre un extrait protégé par le glycérol (ou un autre protecteur comme le mannitol par exemple) et conservé à 4°C gardait son activité 2 à 3 jours. C'est pourquoi toutes les mesures ont été effectuées sur des extraits protégés par le glycérol.

3.1.2. ACTION DES IONS METALLIQUES ET DES ANIONS

Les extraits étaient dialysés 2 heures dans un tampon phosphate 20 mM en présence de 20 % de glycérol et de mercaptoéthanol 10 mM afin d'éliminer les ions $(NH_4)^+$ et K^+ présents.

Comme le montre le tableau 3.1, l'aspartokinase n'a pas d'activité quand aucun ion métallique n'est présent, ou en présence d'ion sodium. L'ion potassium et l'ion ammonium activent l'aspartokinase, ce dernier étant le meilleur activateur.

TABLEAU 3.1

Action des ions métalliques sur l'activité de l'aspartokinase

On a utilisé dans l'essai une concentration 133 mM en ions métalliques. L'activité obtenue est exprimée en pourcentage de celle mesurée en présence de $(NH_4)_2SO_4$.

Addition	% activité aspartokinase
-	0
$(NH_4)_2SO_4$	100 (1)
K_2SO_4	27
Na_2SO_4	0
NH_4Cl	61
KCl	11
NaCl	0
$(NH_4)_2SO_4 + Na_2SO_4$	67

(1) activité spécifique : 5,8 nmoles x mn^{-1} x mg^{-1} protéines.

L'addition simultanée de $(NH_4)_2SO_4$ et de Na_2SO_4 donne une activité de 67 %. Cela permet de supposer une compétitivité entre l'ion ammonium et l'ion sodium.

Cet essai nous a aussi permis de constater que les ions métalliques n'étaient pas seuls à agir sur l'aspartokinase, mais que les anions eux aussi avaient une action (Tableau 3.2).

TABLEAU 3.2

Action des anions sur l'activité de l'aspartokinase

Concentration de l'ion métallique dans essai : 133 mM. L'activité est exprimée en pourcentage de celle mesurée en présence de sulfate d'ammonium.

Addition	% activité aspartokinase
-	0
$(NH_4)_2SO_4$	100 (1)
NH_4Cl	61
NH_4NO_3	119
NH_4CH_3COO	104
$(NH_4)_2SO_4 + NH_4Cl$	77

(1) activité spécifique : 5,3 nmoles x mn^{-1} x mg^{-} protéines.

Ces résultats montrent que tous les anions essayés donnent des activités comparables sauf l'ion chlorure. On peut donc noter une inhibition par le chlorure. Ceci est confirmé par le fait que si l'on ajoute NH_4Cl à l'essai avec $(NH_4)_2SO_4$, on ne retrouve que 77 % de l'activité.

Les mêmes résultats sont retrouvés lorsqu'on remplace l'ammonium par du potassium, comme le montre le tableau suivant (Tableau 3.3).

TABLEAU 3.3

Action des anions sur l'activité de l'aspartokinase

Conditions identiques à celles du tableau 3.2. L'activité est exprimée en pourcentage de celle mesurée en présence de K_2SO_4.

Addition	% activité aspartokinase
K_2SO_4	100
KCl	54
KNO_3	92

On a vérifié chez les souches A20 et 15592 que l'activité était maximum en présence d'ion ammonium. Tous les essais suivants ont été faits en présence de $(NH_4)_2SO_4$.

3.1.3. ACTIVITE DE L'ASPARTOKINASE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ASPARTATE

On a tracé la courbe de l'activité de l'aspartokinase en fonction de la concentration en un substrat, l'aspartate (Figure 3.1). A partir de cette courbe on a pu tracer 1/v (inverse de l'activité) en fonction de 1/s (inverse de la concentration en aspartate) (Figure 3.2) et on en a tiré la valeur du Km pour l'aspartate (Km = 5 mM). En fait, ces courbes ont été tracées à titre indicatif et l'extrait utilisé était un extrait brut. Aucune conclusion définitive ne pourrait être tirée.

3.1.4. INHIBITION PAR LA LYSINE ET LA THREONINE

Les essais ont été faits avec des solutions fraîches de lysine et thréonine ou avec des solutions gardées au congélateur à - 18°C et sur des extraits frais.

- Action de la lysine. La lysine seule n'inhibe pas l'aspartokinase. L'activité est en effet de 100% en présence de lysine 100 mM. On ne note non plus aucune inhibition chez la souche 15592 : une activité 100 % est obtenue en présence d'une concentration de lysine de 100 mM. Chez la souche A20, on a obtenu une inhibition de l'aspartokinase par la lysine (Tableau 3.4) mais cette inhibition se produisait à des concentrations non physiologiques.

TABLEAU 3.4

Inhibition de l'activité de l'aspartokinase de Corynebacterium A20 par la lysine

Concentration de lysine (mM)	Activité (%)
-	100 (1)
10	97
100	77
200	51,5

(1) Activité spécifique : 15,4 nmoles x mn^{-1} x mg^{-1} protéines.

L'activité est donnée en pourcentage de celle mesurée en l'absence d'inhibiteur.

- Action de la thréonine. Par contre, la thréonine seule inhibe l'aspartokinase. Sur la figure 3.3 on a tracé la courbe d'inhibition de l'activité de l'aspartokinase en fonction des concentrations croissantes en thréonine. Des courbes analogues ont été obtenues avec la souche A20 (figure 3.3) et avec la souche 15592 (figure 3.3). On note que chez la souche 15592 l'inhibition par la thréonine n'est pas complète, alors qu'elle l'est presque chez les souches C91 et A20. Le tableau 3.5 illustre ces différences.

TABLEAU 3.5

Inhibition de l'activité de l'aspartokinase par la thréonine

Souches	% inhibition par 1 mM thréonine	% inhibition par 5 mM thréonine
C91	69	90,5
A20	60	74
15592	35	40

- Action de la lysine plus la thréonine. A des concentrations où en l'absence de lysine elle n'inhibe pas ou peu l'aspartokinase, la thréonine,en présence de lysine, inhibe complètement l'aspartokinase. On a pu pour les trois souches tracer des courbes d'inhibition par la thréonine en présence de lysine (Figure 3.4). On a aussi tracé des courbes d'inhibition de l'aspartokinase par la lysine en présence de thréonine (Figure 3.5). Les conditions pour chaque courbe sont données dans les légendes des figures. On remarque chez ces trois souches une action concertée de la lysine plus la thréonine.

Les souches A20 et 15592 donnent dans chaque cas des courbes très semblables. De la même façon que l'aspartokinase de la souche C91 était sensible à des concentrations plus faibles de thréonine, elle est inhibée par des concentrations plus faibles de lysine plus thréonine. En résumé donc ces souches ont une aspartokinase sensible, d'une part à la rétroinhibition par la thréonine seule, d'autre part à une rétroinhibition par la lysine plus la thréonine. La souche C91 semble plus sensible que les deux autres, mais en fait les différences sont minimes.

3.1.5. ACTION D'AUTRES ACIDES AMINES

Nous avons essayé sur l'aspartokinase l'action des autres acides aminés, isoleucine et méthionine, obtenus par la même chaine de biosynthèse. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 3.6. L'isoleucine ou la méthionine n'ont pratiquement aucun effet sur l'aspartokinase à la concentration utilisée.

TABLEAU 3.6

Action des acides aminés seuls sur l'aspartokinase

Addition mM	% activité aspartokinase
-	100 (1)
Thr - 1	20
Lys - 1	108
Ile - 1	104
Met - 1	112

(1) Activité spécifique : 6,25 nmoles x mn^{-1} x mg^{-1} protéines.

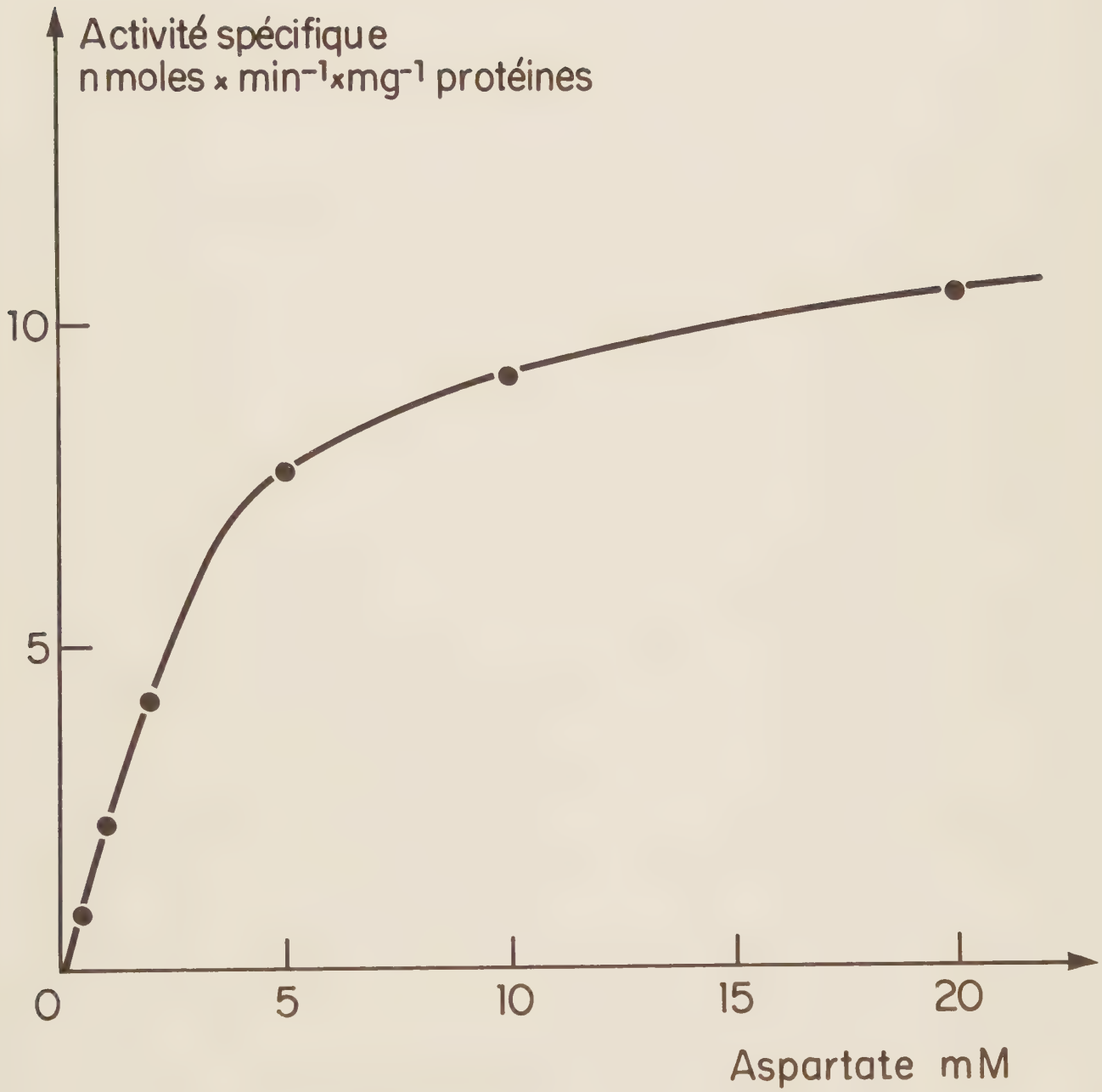


Fig. 3-1. ACTIVITE DE L'ASPARTOKINASE
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ASPARTATE

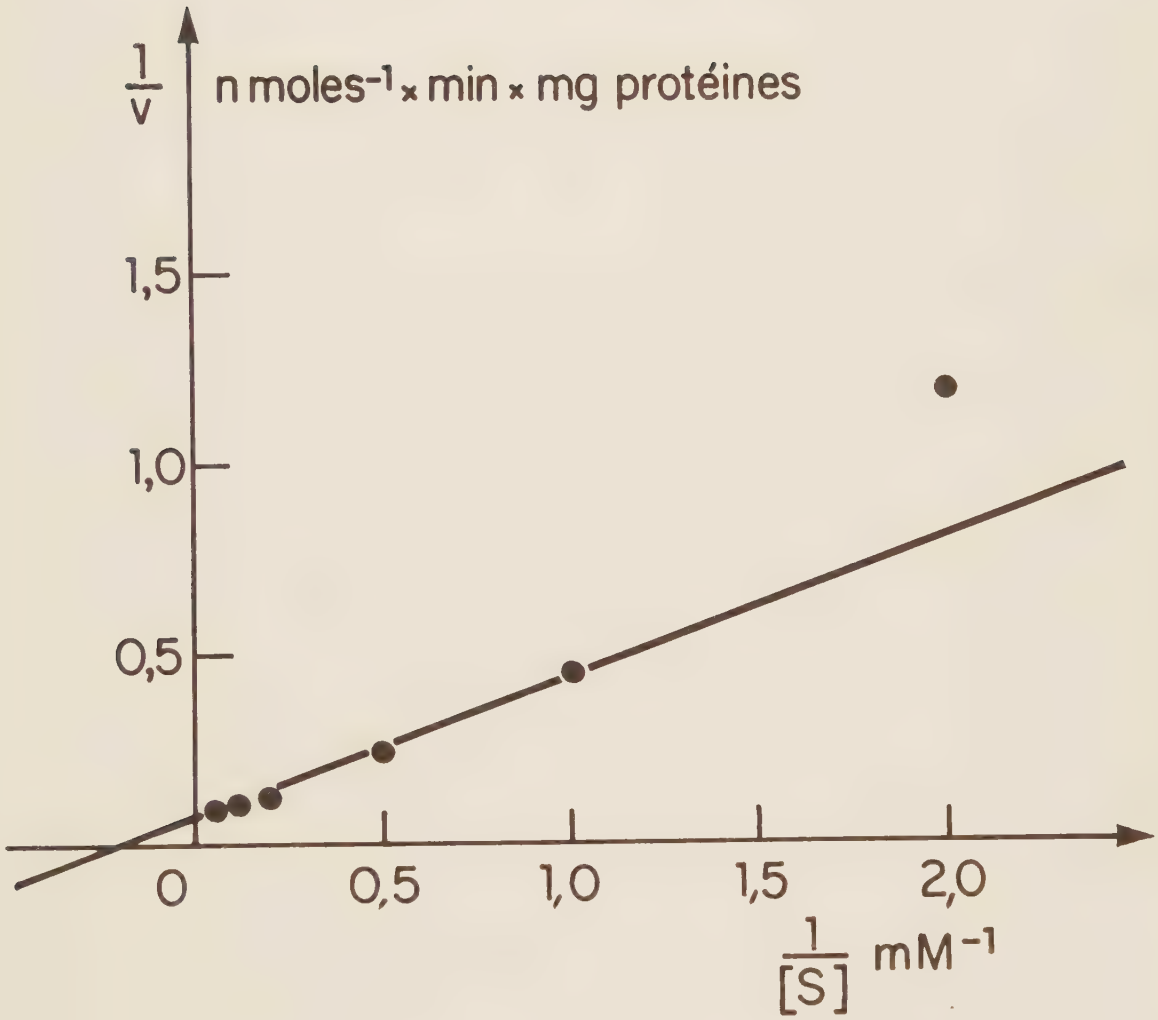


Fig. 3-2. ASPARTOKINASE - DETERMINATION DU Km POUR L'ASPARTATE (Km = 5 mM)

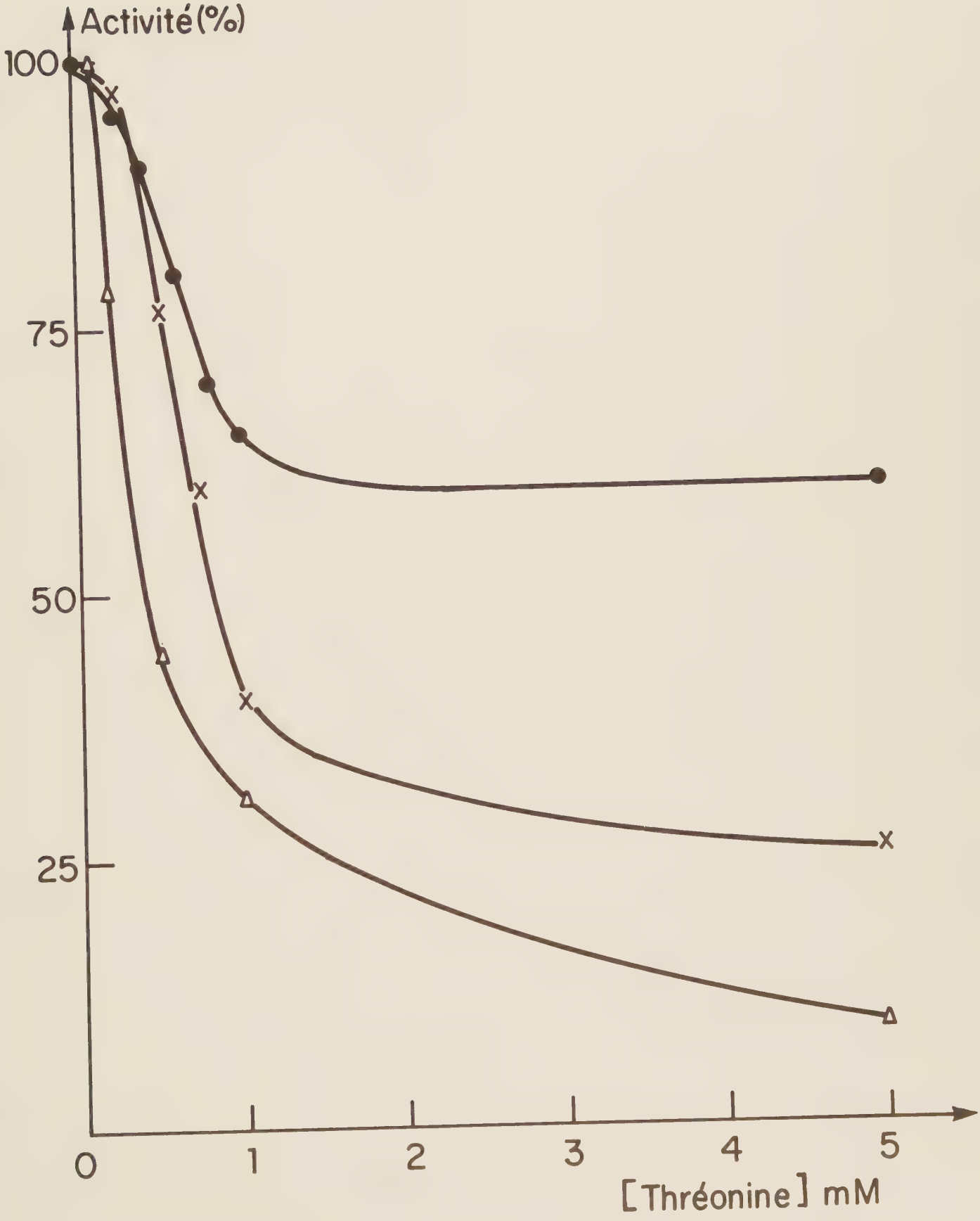


Fig. 3-3. INHIBITION DE L'ACTIVITE ASPARTOKINASE PAR LA THREONINE

—Δ— CHEZ CORYNEBACTERIUM C 91

—X— CHEZ A 20

—●— CHEZ 15 592

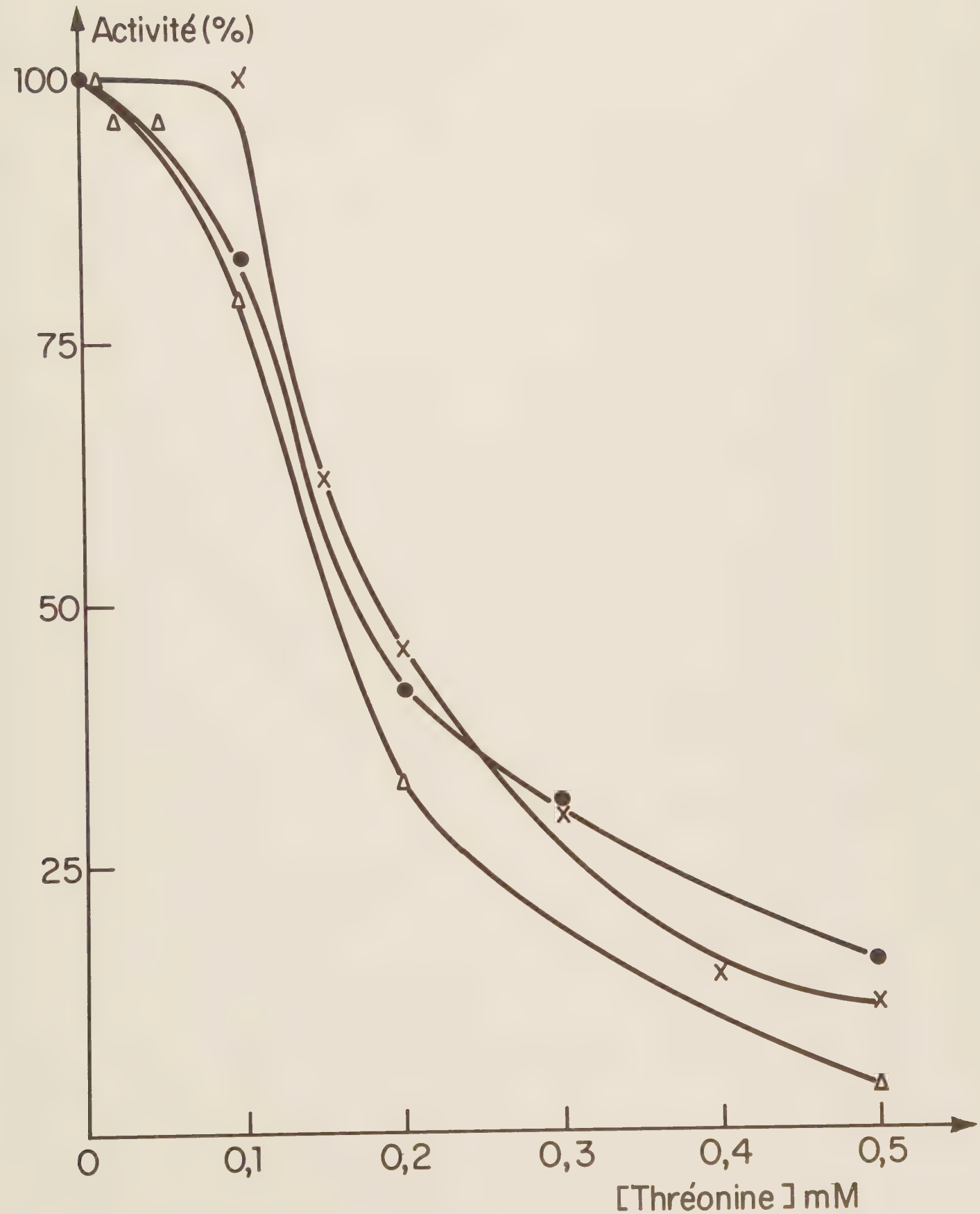


Fig. 3-4. INHIBITION DE L'ACTIVITE ASPARTOKINASE PAR LA THREONINE
EN PRESENCE DE LYSINE 10 mM
—X— CHEZ CORYNEBACTERIUM A 20

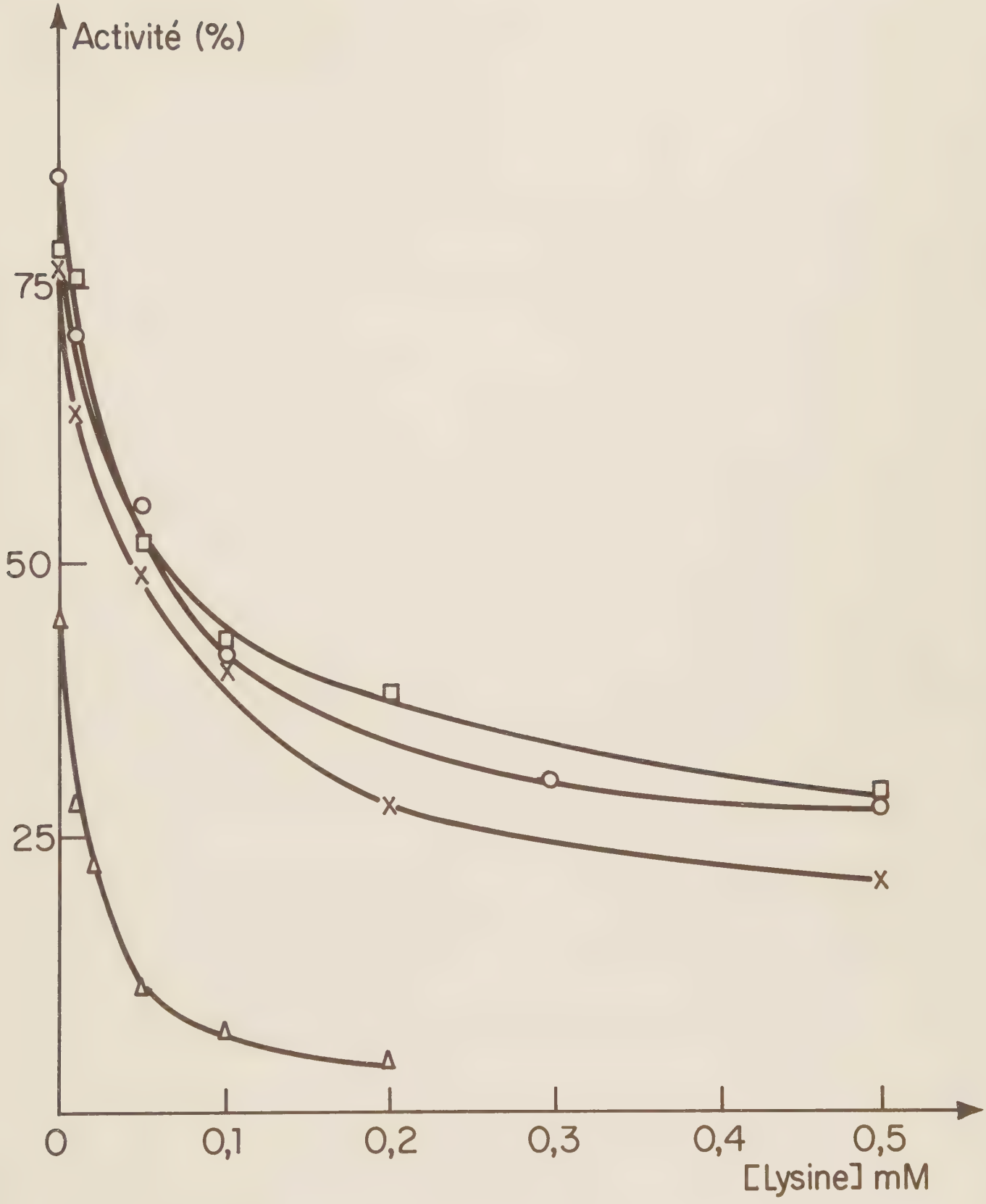


Fig. 3-5. INHIBITION DE L'ACTIVITE ASPARTOKINASE PAR LA LYSINE
EN PRESENCE DE THREONINE 0,5 mM
—X— CHEZ A 20
—O— CHEZ 15 592
—Δ— CHEZ C 91
EN PRESENCE DE THREONINE 0,2 mM
—□— CHEZ C 91

Nous avons alors cherché si l'isoleucine avait une action sur l'inhibition causée par la thréonine et par la thréonine plus la lysine. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 3.7.

TABLEAU 3.7

Action de l'isoleucine sur l'aspartokinase

Addition mM	% activité aspartokinase
-	100
Ile 10	114
Thr 0,5	63,5
Thr 0,5 + Ile 1	75
Thr 0,5 + Ile 10	100
Thr 1	52
Thr 1 + Ile 1	64
Thr 1 + Ile 10	91
Lys 0.1 + Thr 0,2	36
Lys 0,1 + Thr 0.2 + Ile 1	61
Lys 0,1 + Thr 0,2 + Ile 10	100
Lys 1 + Thr 1	6
Lys 1 + Thr 1 + Ile 10	9

On constate que l'isoleucine à forte concentration (10 mM) lève l'inhibition de l'aspartokinase par la thréonine plus la lysine dans certaines conditions. D'abord il faut remarquer que la concentration élevée (10 mM) à laquelle se situe l'action de l'isoleucine rend sa signification physiologique incertaine. Il faut aussi noter une certaine activation par l'isoleucine seule à cette concentration. A concentration plus faible (millimolaire) l'isoleucine a un effet nettement moins caractérisé. De plus lorsque l'inhibition par la lysine plus la thréonine est complète et obtenue par des "excès" de lysine et de thréonine (dernier exemple du tableau 3.7), l'isoleucine même 10 mM n'a aucune action.

Donc en résumé, pour que l'isoleucine lève l'inhibition de l'aspartokinase, il faut que cette isoleucine soit à une concentration élevée et que, au contraire, les concentrations de lysine et de thréonine ne soient pas trop fortes. Ce sont des conditions donc strictes et on peut penser qu'en fait le rôle de l'isoleucine n'est pas capital dans la régulation de cette chaîne de biosynthèse.

Des résultats identiques ont été obtenus avec les souches A20 et 15592 et sont résumés dans les tableaux 3.8 et 3.9.

TABLEAU 3.8

Action de la lysine, la thréonine, l'isoleucine seuls ou en combinaison sur l'aspartokinase de la souche A20

Addition, mM	% activité aspartokinase A20
-	100 (1)
Thr 1	48,5
Lys 1	100
Ile 10	108
Thr 1 + Ile 1	59,5
Thr 1 + Ile 10	92
Thr 0,2 + Lys 0,2	40,5
Thr 0,2 + Lys 0,2 + Ile 1	54
Thr 0,2 Lys 0,2 + Ile 10	95
Thr 1 + Lys 1	3
Thr 1 + Lys 1 + Ile 10	3

(1) Activité spécifique : 11,1 nmoles x mn^{-1} x mg^{-1} protéines.

TABLEAU 3.9

Action de la lysine, la thréonine, la méthionine et l'isoleucine sur l'aspartokinase de la souche 15592

Addition, mM	% activité aspartokinase
-	100 (1)
Thr 1	70,4
Lys 1	108
Met 1	96
Ile 5	102
Thr 1 + Ile 5	80,5
Thr 1 + Lys 1	29
Thr 1 + Lys 1 + Ile 5	41

(1) Activité spécifique : 7,7 nmoles x mn^{-1} x mg^{-1} protéines.

3.1.6. ACTION D'UN ANALOGUE DE LA LYSINE

Nous avons essayé aussi sur l'aspartokinase, l'action d'un analogue de la lysine, l'amino-éthyl cystéine. Le tableau montre que l'inhibition par l'amino-éthyl-cystéine plus la thréonine est du même ordre de grandeur que celle obtenue par la lysine plus la thréonine (Tableau 3.10)

TABLEAU 3.10

Action de l'aminoéthylcystéine sur l'aspartokinase de C91

Addition, mM	% activité aspartokinase en présence d'AEC	% activité aspartokinase en présence de lysine
-	100 (1)	100 (2)
AEC (ou Lys) 10	90	100
Thr 0,2	71	-
AEC (ou Lys) 10 + Thr 0,2	17,3	21,2
AEC (ou Lys) 1 + Thr 0,2	28,8	26
AEC (ou Lys) 1 + Thr 0,05	54	52

(1) Activité spécifique : 5,3 nmoles x mn^{-1} x mg^{-1} protéines.
(2) Activité spécifique : 5,8 nmoles x mn^{-1} x mg^{-1} protéines.

3.2. DIHYDRODIPICOLINATE SYNTHETASE

CONDITIONS D'ESSAI - Les extraits étaient préparés de la même façon que ceux utilisés pour la mesure de l'aspartokinase et l'activité était mesurée selon la méthode de Yugari et Gilvarg (70). Préparé sans glycérol l'extrait perdait 40 % de son activité en 24 heures. Protégé par le glycérol et conservé à 4°C, il n'y avait pas de perte notable d'activité pendant quelques jours. Cependant, toutes les mesures ont été faites sur des extraits frais et protégés.

ACTION DES IONS METALLIQUES - La dihydrodipicolinate synthétase ne semble pas sensible à l'action des ions métalliques ainsi que le montre le tableau 3.11.

TABLEAU 3.11

Addition	% activité
-	110 (1)
KCl (66 mM)	100
$(NH_4)_2SO_4$ (66 mM)	105

(1) Activité spécifique : 2,35 10^{-3} ΔDO x mn^{-1} x mg^{-1} protéines.

ACTION DE LA LYSINE ET DE L'ACIDE DIAMINOPIMELIQUE - La dihydrodipicolinate synthétase de ces souches semble peu sensible à la rétroinhibition par la lysine ou le diaminopimélate. Cependant on obtient une faible inhibition par l'un ou l'autre de ces acides

aminés mais à des concentrations qui ne sont vraisemblablement pas physiologiques (Tableau 3.12). On peut donc conclure en disant que chez aucune de ces trois souches il n'y a de régulation de la biosynthèse par rétroinhibition au niveau de la dihydrodipicolinate synthétase.

TABLEAU 3.12

Action de la lysine et du diaminopimélate sur la dihydrodipicolinate synthétase de C91, A20 et 15592

Addition	% activité C91	% activité A20	% activité 15592
-	100 (1)	100 (2)	100 (3)
Lysine 10 mM	86	80,7	106,5
Lysine 50 mM	68	ND	ND
Lysine 100 mM	68	77	83,6
DAP 1 mM	ND	96,5	ND
DAP 20 mM	86	ND	ND

(1) Activité spécifique : $2,3\ 10^{-3}$ ΔDO x mn^{-1} x mg^{-1} protéines.
(2) " " : $2,3\ 10^{-3}$ " " "
(3) " " : $1,8\ 10^{-3}$ " " "
ND = non déterminé

3.3. HOMOSERINE DESHYDROGENASE

3.3.1. CONDITIONS D'ESSAI

On a essayé de mesurer l'activité de l'homosérine déshydrogénase dans les deux sens de la réaction. Dans le sens homosérine ⟶ aspartate semi-aldéhyde l'activité était très faible. Dans le sens aspartate semi-aldéhyde ⟶ homosérine la mesure était très délicate, la réaction n'étant pas linéaire en fonction du temps. Cette non linéarité aurait pu être due à la compétitivité entre la réaction catalysée par l'homosérine déshydrogénase,

Aspartate semi-aldéhyde ⇄ Homosérine
(NADPH / NADP)

et celle catalysée par l'aspartate semi-aldéhyde déshydrogénase,

Aspartate semi-aldéhyde + P_i ⇄ β-Aspartyl-Phosphate
(NADP / NADPH)

le NADP formé dans la première réaction servant pour la seconde.

Nous avons alors essayé de dialyser l'extrait dans du tampon Tris ou du tampon imidazole pour éliminer le phosphate nécessaire à cette deuxième réaction mais sans résultat même après plusieurs dialyses.

Divers autres essais tendant à améliorer la mesure de l'homosérine déshydrogénase n'ont pas abouti. Nous avons donc malgré tout fait quelques mesures en prenant la pente à l'origine de la courbe d'oxydation du NADPH en fonction du temps.

Cette enzyme est très instable. Il y a perte de 80 % de l'activité en 24 heures dans un extrait non protégé. Même protégé par le glycérol, l'activité de l'homosérine déshydrogénase baisse de 50 % en quelques jours. C'est pourquoi toutes les mesures effectuées l'ont été avec des extraits frais.

ACTION DU POTASSIUM - Le potassium active l'homosérine déshydrogénase. En l'absence de potassium dans la cuve d'essai, l'activité de l'enzyme est nulle et l'ammonium ne remplace en aucune sorte le potassium (Tableau 3.13). De plus si l'extrait est dialysé contre un tampon phosphate 20 mM additionné de tous les protecteurs sauf le chlorure de potassium, l'enzyme perd irréversiblement son activité. En effet même en ajoutant du potassium au milieu réactionnel, l'activité est nulle. Le potassium est donc indispensable non seulement à l'activité de l'homosérine déshydrogénase mais aussi à la stabilité de cette enzyme.

TABLEAU 3.13

Action du potassium sur l'homosérine déshydrogénase

Extrait	Addition	% activité
Extrait protégé par KCl	-	0
	KCl (66 mM)	100
	$(NH_4)_2SO_4$ (66 mM)	0
Extrait dialysé sans KCl	-	0
	KCl (66 mM)	0

3.3.2. INHIBITION PAR LES AMINOACIDES

ACTION DE LA THREONINE - La thréonine inhibe l'homosérine déshydrogénase. On a pu tracer la courbe donnant l'activité de l'enzyme en fonction de la concentration en thréonine présente dans l'essai (Figure 3.6). Cette courbe est donnée à titre indicatif étant donné les difficultés de mesurer avec précision l'activité de cette enzyme.

ACTION DE L'ISOLEUCINE - L'isoleucine n'a aucune action sur l'activité homosérine déshydrogénase. De plus l'isoleucine même à concentration élevée (10 mM) n'a aucune action sur l'inhibition de l'enzyme due à la thréonine.

Quelques essais sur les souches A20 et 15592 nous ont conduits aux mêmes résultats essentiels : grande instabilité de l'enzyme, inhibition par la thréonine et absence d'action de l'isoleucine.

3.4. ACTION DE LA LYSINE, METHIONINE ET THREONINE SUR LA CROISSANCE DE LA SOUCHE C91

On a constaté que dans certaines conditions de culture de cette souche C91, la lysine, la thréonine et la méthionine avaient une action sur la croissance de la souche, soit séparément, soit en combinaison dans certaines conditions. Au cours de cette étude on a pu montrer, en effet, que l'action des acides aminés et analogues sur la croissance dépendait des conditions de culture, plus précisément des sources de carbone et d'azote utilisées. Cette question sera développée dans le dernier chapitre (p.62).

On a donc cultivé la souche C91 sur un milieu R où le sulfate d'ammonium a été remplacé en quantité équivalente par du nitrate de sodium. Le substrat était l'acétate. On a ajouté à diverses fioles des quantités données de chacun des acides aminés, soit séparément soit ensemble et on a suivi la croissance des différentes fioles en mesurant la densité optique à 550 nm. Cela nous a permis d'obtenir les courbes de croissance de la figure 3.7. On constate d'abord que la thréonine agit sur la croissance à des concentrations beaucoup plus faibles que la lysine et la méthionine. On avait déjà remarqué la grande sensibilité de l'aspartokinase et de l'homosérine déshydrogénase à la thréonine.

On note une inhibition de la croissance par la thréonine, et plus encore par l'association lysine-thréonine. Cette inhibition de la croissance est levée dans les deux cas par la méthionine. D'autre part, la lysine seule, la méthionine seule ou l'association lysine plus thréonine plus méthionine ou seulement méthionine plus thréonine activent la croissance.

De cette étude on peut tirer plusieurs conclusions :

- l'action des acides aminés sur la croissance n'est observable que dans certaines conditions. Ce phénomène sera étudié plus loin.

- on constate que comme pour les enzymes de la biosynthèse, la thréonine ou l'association lysine plus thréonine sont inhibiteurs. En particulier l'association thréonine plus lysine semble très efficace puisqu'il n'y a aucune croissance en 48 heures.

- l'activation soit par la lysine ou la méthionine, ou par l'association de plusieurs acides aminés peut s'expliquer par leur utilisation par les cellules qui s'épargnent ainsi leur biosynthèse.

CONCLUSION

Bien que l'étude des souches A20 et 15592 ait été fort incomplète, il ne semble toutefois pas prématuré de dire que ces trois souches ont des caractéristiques semblables et que les conclusions que nous pouvons tirer sont sans nul doute les mêmes pour les trois.

Dans cette conclusion nous ne perdons pas de vue notre but qui est d'obtenir des mutants excrétant de la lysine. La régulation par rétroinhibition des enzymes de la biosynthèse de la lysine ne s'effectue ici que sur

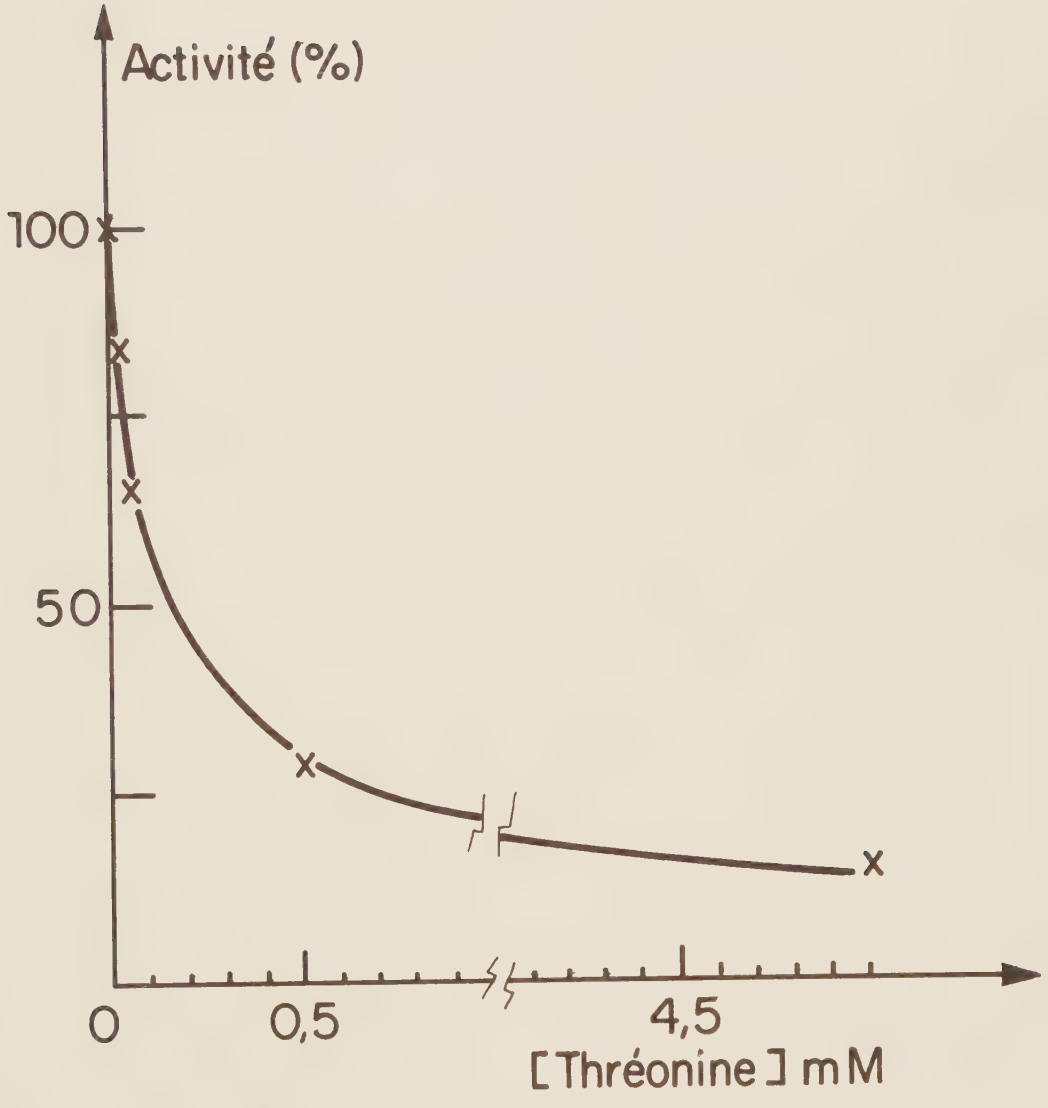


Fig. 3-6. INHIBITION DE L'ACTIVITE HOMOSERINE DESHYDROGENASE PAR LA THREONINE

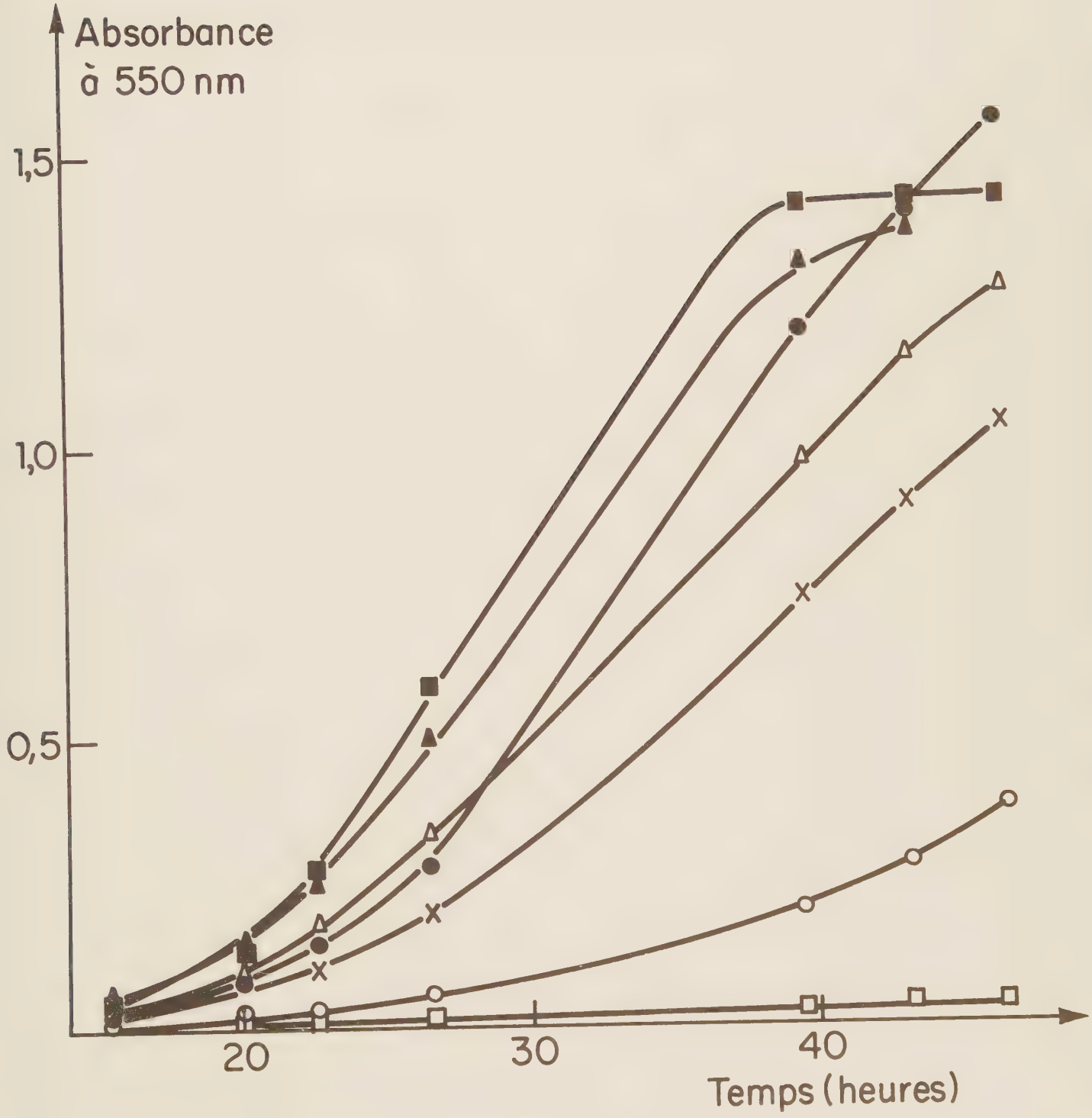


Fig. 3-7. ACTION DE DIVERS ACIDES AMINES SUR LA CROISSANCE DE LA SOUCHE C 91

ADDITIONS (mM) :

—X— AUCUNE
—O— Thr 0,05
—Δ— Thr 0,05 + Met 1
—□— Thr 0,05 + Lys 1
—●— Lys 1
—▲— Met 1
—■— Thr 0,05 + Lys 1 + Met 1

une seule enzyme, l'aspartokinase. D'éventuels mutants dérégulés sur l'aspartokinase, seraient donc susceptibles d'excréter de la lysine puisque la dihydrodipicolinate synthétase n'est pas régulée, au contraire de ce qui se passe chez E. coli et Pseudomonas. De même un mutant auxotrophe exigeant en homosérine (donc incapable de synthétiser la thréonine), cultivé avec des quantités limitantes de thréonine devrait excréter de la lysine.

C'est pourquoi l'obtention et l'étude de chacun de ces deux types de mutants a constitué l'orientation principale de ce travail.

CHAPITRE IV

DEGRADATION DE LA LYSINE : LA L-AMINOACIDE OXYDASE DE CORYNEBACTERIUM

Comme on l'a déjà indiqué, un point très important concernant l'utilisation de souches pour l'excrétion de lysine est l'existence éventuelle chez ces souches d'un système de dégradation de la lysine, et, au cas où un tel système existe les conditions dans lesquelles il fonctionne.

Nous avons trouvé qu'effectivement la lysine était dégradée chez nos souches mais seulement dans des conditions particulières, par une enzyme non spécifique de la lysine, une L-aminoacide oxydase.

La présence de cette enzyme a été observée dans le foie de mammifères et d'oiseaux (55), (56), chez Neurospora Crassa (53)(54)(24) et dans le venin serpent(47), (48), (49), (50), (51), (52), (60). L'enzyme provenant de cette dernière source, en particulier, a fait l'objet de travaux nombreux. Son existence chez les bactéries (57), (59), (60) est au contraire très peu connue et c'est pourquoi nous avons essayé de l'étudier un peu plus précisément. Il nous a, notamment, paru intéressant de caractériser cette enzyme et d'essayer de mettre son existence en évidence chez d'autres espèces.

Tous les résultats qui suivent ont été obtenus en utilisant la souche A20.

4.1. CONDITIONS DE CULTURE

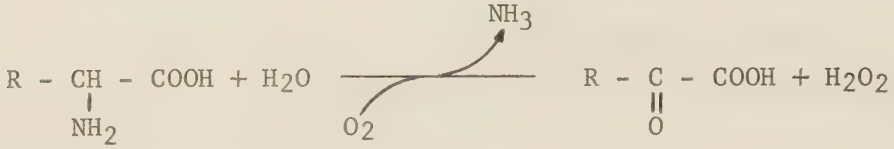
Les premiers essais relatifs à la dégradation de la lysine chez la souche A20 ont consisté à cultiver cette souche sur des milieux ne contenant que la lysine comme seule source d'azote ou comme seule source de carbone. Le milieu minéral était le milieu R dont on avait omis le sulfate d'ammonium. On a d'abord constaté que A20 n'utilisait la lysine que comme source d'azote et pas comme source de carbone. Nous avons alors préparé un extrait enzymatique avec des cellules récoltées sur un milieu ne contenant que la lysine comme source d'azote et du glucose comme substrat et nous avons trouvé une enzyme consommant l'oxygène que nous avons identifiée (voir paragraphe suivant) comme une L-aminoacide oxydase.

L'extrait était préparé dans un tampon phosphate 20 mM, pH 7 en présence de KCl 66 mM et de mercaptoéthanol 10 mM.

Ce sont ces conditions qui ont été utilisées tout au long de cette étude sauf précisions contraires.

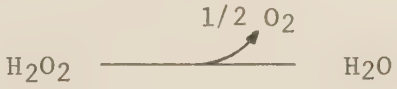
4.2. IDENTIFICATION

Comme on l'a déjà signalé (chapitre 2), la réaction catalysée par l'oxydase est la suivante :



qui est suivie par la réaction non enzymatique suivante :

Cependant en présence de catalase la deuxième réaction n'a pas lieu et est remplacée par la réaction suivante :



En conséquence si on ajoute à un extrait contenant une oxydase (productrice de H_2O_2) de la catalase en excès, la consommation d'oxygène est divisée par 2, ce qui constitue un test d'identification de ce type d'enzyme. Bien entendu ceci suppose que l'extrait lui-même ne contienne pas de catalase. C'est pourquoi nous avons mesuré la catalase dans nos extraits enzymatiques. Dans un extrait frais, la catalase était présente et non négligeable. L'identification de l'oxydase était alors impossible. Cependant, dans un extrait conservé à 4°C de 1 à 2 semaines, la catalase devenait négligeable alors qu'au contraire l'oxydase ne perdait pratiquement pas d'activité. L'identification de l'oxydase selon le test décrit devenait alors possible. Le tableau 4.1 illustre la perte d'activité de la catalase avec le temps.

TABLEAU 4.1

Mesure de la catalase dans un extrait

Conservation de l'extrait à 4°C	Activité catalase U/ml
1 jour	310
8 jours	10

4.3. INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE DE LA SOUCHE

On a étudié les conditions requises pour obtenir une activité oxydase. On a donc cultivé la souche A20 avec différentes sources d'azote, en présence ou non de lysine, ou avec des quantités limitantes des sources d'azote utilisées et on a mesuré l'activité oxydase obtenue dans chacun de ces cas.

Les résultats sont donnés dans le tableau 4.2.

TABLEAU 4.2

Activité de la L-aminoacide oxydase

selon les conditions de culture de la souche

Source d'azote utilisée dans le milieu de culture	Activité spécifique * avec la lysine comme substrat	Activité spécifique * avec la cystéine comme substrat
$(NH_4)_2SO_4$ 2 g/l	0	0
$NaNO_3$ 2 g/l	~0	~0
$(NH_4)_2SO_4$ 0,1 g/l (quantité limitante)	1,22	3,4
$NaNO_3$ 0,128 g/l (quantité limitante)	2,3	3,3
$(NH_4)_2SO_4$ 2 g/l + 10 mM lys	0,41	2,08
$NaNO_3$ 2 g/l + 10 mM lys	5,5	8,35
10 mM lysine	13-25	20-30

* l'activité spécifique est exprimée en nanomoles d'oxygène absorbées par minute et par mg de protéines. Elle a été mesurée sur des extraits frais donc en présence de la catalase endogène contenue dans l'extrait.

Les activités ont été mesurées en utilisant d'abord la lysine comme substrat puisque la lysine est le substrat nous intéressant, puis la cystéine qui est le meilleur substrat de cette enzyme (voir p.43), les résultats se vérifiant les uns les autres.

On constate qu'il n'y a aucune activité lorsque la culture est faite avec une source d'azote en excès et en l'absence de lysine. On trouve par contre une légère activité lorsque les sources d'azote sont limitantes, ou lorsqu'on ajoute de la lysine à une source d'azote en excès.

Mais ces activités sont beaucoup plus faibles que celles obtenues en utilisant la lysine comme seule source d'azote.

Plusieurs hypothèses variant dans certains détails peuvent expliquer ces résultats, mais deux points importants semblent clairement démontrés. D'abord la L-aminoacide oxydase est une enzyme induite par la lysine (et éventuellement par d'autres acides aminés), mais de plus elle n'est pas synthétisée en présence d'une autre source d'azote, en particulier en présence d'ions ammonium. L'hypothèse la plus vraisemblable serait la répression de sa biosynthèse par les ions

ammonium. Cependant, il est également possible que les ions ammonium soient inhibiteurs d'une L-aminoacide perméase. Cette seconde hypothèse est étayée par d'autres faits et sera discutée au chapitre VI (page 63).

4.4. ETUDE D'UNE EVENTUELLE RELATION DE L'AMINOACIDE OXYDASE AVEC LE METABOLISME ENDOGENE

Plusieurs études ont mis en évidence la production extracellulaire d'ammoniaque par des suspensions non proliférantes de nombreux microorganismes tels que P. aeruginosa (82), P. flurescens, E. coli, B. subtilis, S. cerevisiae (83) et A. aerogenes (84). Cette excrétion d'ammoniaque qui résulte du métabolisme endogène de ces microorganismes est due en particulier à la dégradation des protéines utilisées alors comme source d'énergie (84), et d'ailleurs l'addition d'une source d'énergie telle que le glucose provoque en général la réincorporation de l'ammoniaque libéré (83). La spécificité très large de l'aminoacide oxydase mise en évidence ici, suggérait un rôle possible pour cette enzyme dans le phénomène d'excrétion d'ammoniaque à partir d'aminoacides issus d'une dégradation des protéines dans les conditions utilisées par les auteurs qui viennent d'être cités. On a donc d'abord tenté de mettre en évidence l'excrétion d'ammoniaque chez la souche A20, et on a effectué des incubations à 30°C avec agitation de suspensions de cellules dans un milieu minéral dépourvu d'azote, en présence ou en l'absence d'une source de carbone (glucose 1 %). Après 24 heures d'incubation, l'absorbance à 550 nm de la suspension incubée sans substrat était passée de 10 à 8,6 tandis que celle de la suspension incubée avec du glucose avait varié de 10 à 14. Cependant aucune excrétion d'ammoniaque (mesurée par le réactif de Nessler après une microdiffusion effectuée sur la suspension cellulaire par du carbonate de potassium saturé) n'était décelable dans chacun des deux cas. D'autre part, on peut remarquer que certaines des espèces chez qui l'excrétion d'ammoniaque a été démontrée, semblent bien dépourvues d'aminoacide oxydase (voir p.48) et on ne peut donc pas effectuer de corrélation entre l'excrétion d'ammoniaque et la présence de l'aminoacide oxydase.

D'autres éléments viennent d'ailleurs appuyer une telle conclusion. En effet le rôle de l'aminoacide oxydase n'est pas de permettre l'utilisation des protéines comme source d'énergie (d'ailleurs la lysine qui est substrat et inducteur de cette enzyme n'est pas utilisable comme source de carbone par les cellules) mais bien comme exposé plus loin (voir p.49) de servir pour la production d'azote assimilable à partir d'aminoacides.

4.5. STABILITE

Cette L-aminoacide oxydase s'est révélée être extrêmement stable en présence de KCl 66 mM et de 2-mercaptoéthanol 10 mM. A température ordinaire (20°C), l'extrait conservé dans ces conditions perd 50 % de son activité en un mois. A 4°C par contre, on note seulement une perte d'activité de 5 à 10 % par mois (Figure 4.1). En l'absence de protecteurs par contre, la stabilité de l'enzyme est beaucoup moins grande. On a en effet mesuré l'activité

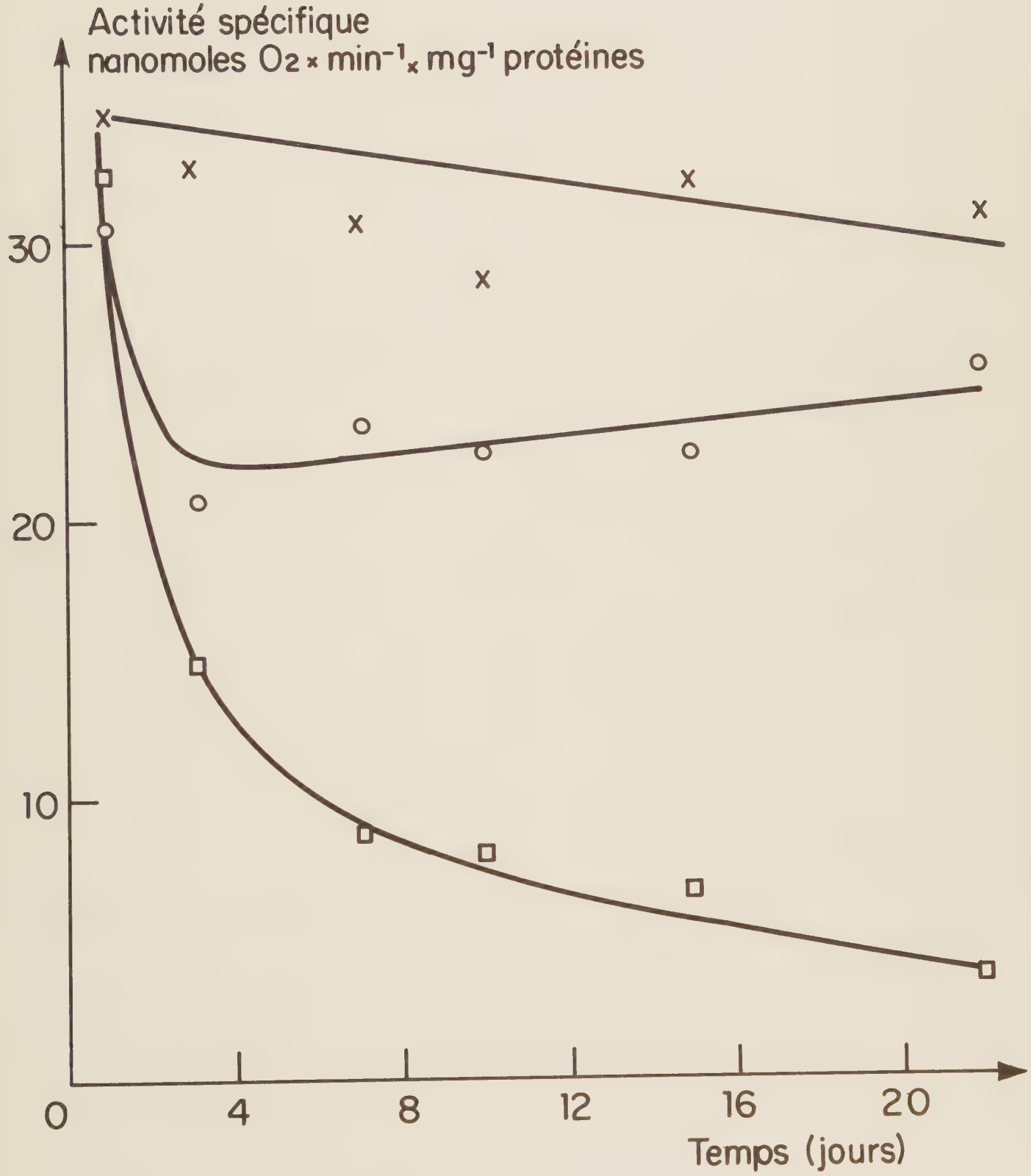


Fig. 4-1. CONSERVATION DE LA L-AMINOACIDE OXYDASE.
L'ENZYME EST CONSERVEE DANS DU TAMPON PHOSPHATE
ADDITIONNE DE 2-MERCAPTOETHANOL + KCl —X—
OU DE KCl —O—
OU DE 2-MERCAPTOETHANOL —□—

d'un extrait conservé à 4°C et partagé en trois parties : 1'une était conservée dans du tampon phosphate 20 mM additionné de 2-mercaptoéthanol 10 mM et de KCl 66 mM, la deuxième partie dans du tampon plus KCl et la troisième partie dans le tampon plus mercaptoéthanol. (Le chlorure de potassium ou le mercaptoéthanol avait été selon le cas enlevé de l'extrait par une dialyse respectivement dans du tampon phosphate 20 mM additionné de mercaptoéthanol 10 mM ou dans du tampon phosphate 20 mM additionné de KCl 66 mM), (Figure 4.1). On constate que le chlorure de potassium est indispensable à la conservation de l'enzyme. En l'absence de KCl il y a une perte de 66 % d'activité en trois jours. Cette perte d'activité est irréversible et le fait d'ajouter du KCl au moment de la mesure ne change rien au résultat. Par contre en l'absence de 2-mercaptoéthanol, il y a une légère baisse de l'activité mais celle-ci se stabilise ensuite.

4.6. SPECIFICITE ET INDUCTEURS

Spécificité

Presque tous les acides aminés naturels sont des substrats pour la L-aminoacide oxydase. Mais les activités obtenues varient selon la nature des aminoacides. On a aussi essayé comme substrats des acides aminés d'origine synthétique et des analogues d'acides aminés. Les résultats sont résumés dans le tableau 4.3.

TABLEAU 4.3

Etude des substrats de la L-aminoacide oxydase

strat	Activité spécifique	Substrat	Activité spécifique	Substrat	Activité spécifique
Lys	19,8	L-Val	5,67	L-Homosérine	19,8
Asp	1,4	L-Ser	10,4	L-Ornithine	26,2
Arg	19,2	L-Thr	0,5	DL-diaminopimélate	17,3
Gly	1,57	L-Tyr	17,6	DL-α-aminobutyrate	22
Ile	11,95	L-Pro	2,2	DL-β-aminobutyrate	0
Leu	17,3	L-Trp	12,3	DL-α-aminocaprylate	21,9
His	23,6	L-Glu	6,77		
Met	17,3	L-Cystéine	28,4	DL-lactate	0
Phe	13,55	L,L-Cystine	18,6	L-malate	0
Ala	17,6	D-Ala	0,6		

Conditions : L'oxydase était mesurée avec une concentration en substrat de 2 mM pour les L acides aminés et 4 mM pour les DL acides aminés.

On constate que les L-α-aminoacides sont les substrats de cette enzyme. Par contre les β-aminoacides ainsi que les D-α-aminoacides ne sont pas utilisés, pas plus que la glycine et la proline ce qui peut s'expliquer par leur conformation. En ce qui concerne les L-α-aminoacides, aussi bien les composés naturels que certains produits synthétiques sont utilisés. Hormis le cas de la cystéine, le meilleur substrat, les autres substrats préférés semblent les acides aminés basiques.

Inducteurs

On a aussi essayé de remplacer la lysine par d'autres acides aminés dans les cultures. On a ainsi utilisé pour induire l'oxydase, l'alanine, l'acide glutamique et la méthionine. On a obtenu en général des activités plus faibles que celles données par la lysine. Cependant, ces essais n'ayant été faits qu'une seule fois aucune conclusion définitive ne peut être tirée de ces résultats.

Par contre, il est intéressant de noter que si l'on trace une "échelle" des activités dues aux différents substrats possibles dans les différents cas d'induction, le "classement" des substrats est le même quel que soit l'inducteur. Ainsi dans les quatre cas étudiés ici, la cystéine est le meilleur substrat. On trouve ensuite, aux erreurs d'expérience près, l'ornithine, l'histidine, l'acide DL-α-aminobutyrique (Tableau 4.4.)

TABLEAU 4.4

Activité selon différents substrats de la L-aminoacide oxydase induite par différents acides aminés

Inducteur / Substrat	L-lysine	L-Alanine	L-acide glutamique	L-Méthionine
L-Cystéine	28,4	2,1	5,12	14,1
L-Ornithine	26,2	0,32	3,5	13,4
L-Histidine	23,6	0,32	1,77	12,9
DL-α-amino-butyrate	22	ND	ND	12
L-Homosérine	19,8	ND	ND	13,4
L-Lysine	19,8	0,65	1,36	12
L-Arginine	19,2	ND	ND	ND
L,L-Cystine	18,6	ND	ND	ND
L-Alanine	17,6	0,65	ND	ND
L-Méthionine	17,3	ND	0,85	8,74
L-Phénylalanine	13,55	ND	ND	9,25
L-Glutamate	6,77	ND	0,85	8,3
L-Proline	2,2	ND	ND	2,76
L-Thréonine	0	ND	ND	3,7

ND = non déterminée

Ces premiers résultats peuvent laisser supposer qu'il existe une seule L-aminoacide oxydase quel que soit l'acide aminé qui l'induit. Ce n'est là qu'une hypothèse que seule une étude plus complète de l'enzyme permettrait de vérifier.

4.7. ACTION DU PH

On a mesuré l'activité d'un extrait en utilisant différents tampons à différents pH. On a alors tracé les courbes de la figure 4.2. On remarque que le tampon Tris est le meilleur tampon pour la mesure de l'oxydase. L'étude de ces courbes permet de déterminer que le pH optimum pour la réaction se situe entre 8 et 9. Dans toutes les expériences effectuées nous avons utilisé un tampon Tris acétate pH 8.

4.8. ACTION DE LA MOLARITE DU TAMPON

On a fait varier la concentration de tampon présente dans la cellule de mesure. On a ainsi pu tracer la courbe de la figure 4.3. On constate que l'on atteint un plateau d'activité à partir d'une concentration de 2 mM en tampon Tris. On utilise pour toutes les mesures un grand excès de tampon (156 mM).

4.9. INACTIVATION THERMIQUE

Quelques essais concernant l'inactivation thermique de la L-aminoacide oxydase ont été effectués dans le but éventuel d'utiliser un traitement thermique pour la purification de cette enzyme. On a constaté qu'à 50°C l'enzyme perdait 50% de son activité en 10 minutes et qu'à 60°C elle était complètement inactivée en 1 minute. Cette enzyme semble donc assez sensible à la chaleur et un traitement thermique était donc inutilisable pour la purification de cette enzyme

Il est probable que si l'on avait protégé l'enzyme par le substrat, les résultats obtenus auraient pu être totalement différents. Cependant, la manipulation aurait alors dûe être effectuée sous atmosphère d'azote pour éviter à la réaction enzymatique d'avoir lieu.

4.10. ETUDE CINETIQUE

Cette étude nous a, d'une part donné à titre indicatif les Km de la L-aminoacide oxydase pour quelques substrats et, d'autre part, permis de constater qu'il existait une inhibition de l'activité par excès de substrat.

4.10.1. MESURE DES Km

Le premier substrat étudié a été la lysine, parce que la lysine était l'aminoacide qui nous intéressait le plus. On a tracé la courbe de l'activité en fonction de la concentration en lysine (Figure 4.4). Ensuite à partir de cette courbe on a tracé la courbe des inverses 1/V en fonction de 1/S (Figure 4.5). De la droite obtenue nous avons tiré le Km qui est égal à 4.10^{-2} mM.

A titre de comparaison les mêmes courbes ont été tracées pour la cystéine (Figures 4.6 et 4.7) et pour la phenylalanine (Figures 4.8 et 4.9). On a obtenu respectivement un Km de 5.10^{-2} mM pour la cystéine et un Km de $1,1\ 10^{-2}$ mM pour la phenylalanine.

4.10.2. INHIBITION PAR EXCES DE SUBSTRAT

En traçant les courbes d'activité en fonction du substrat (les courbes des figures 4.4, 4.6 et 4.8) on s'est aperçu qu'en augmentant la concentration en substrat l'activité au lieu de tendre vers un palier, passait par un maximum et diminuait (Figure 4.10). On était en présence d'un cas d'inhibition de l'activité par excès de substrat. En traçant 1/v en fonction de la concentration en substrat selon Dixon et Webb (118), on obtient une droite donnant pour la lysine une constante d'inhibition par le substrat K'_s de 8,3 mM dans les conditions utilisées.

Le maximum d'activité de la L-aminoacide oxydase était obtenu pour une concentration en substrat comprise entre 0,1 mM et 2 mM. La concentration usuelle utilisée au cours de toutes nos mesures était 0,2 mM de façon à mesurer une activité maximum et à éviter l'inhibition par excès de substrat.

4.11. ESSAIS DE PURIFICATION DE LA L-AMINOACIDE OXYDASE

Nous avons tenté en quelques étapes simples qui sont une ultracentrifugation, une précipitation au sulfate d'ammonium et un passage sur une colonne de Sephadex G-200 de faire une purification sommaire de la L-aminoacide oxydase.

• ULTRACENTRIFUGATION - On a centrifugé l'extrait brut pendant 2 heures à 4°C à 155 000 g dans une ultracentrifugeuse. Dans ces conditions, nous avons recueilli un surnageant dans lequel se trouvait l'activité de la L-aminoacide oxydase.

Le bilan total des activités oxydases trouvées après centrifugation dans le précipité non lavé et le surnageant est donné dans le tableau 4.5. Ceci démontre clairement que dans les conditions utilisées (traitement des cellules aux ultra-sons) la L-aminoacide oxydase est solubilisée.

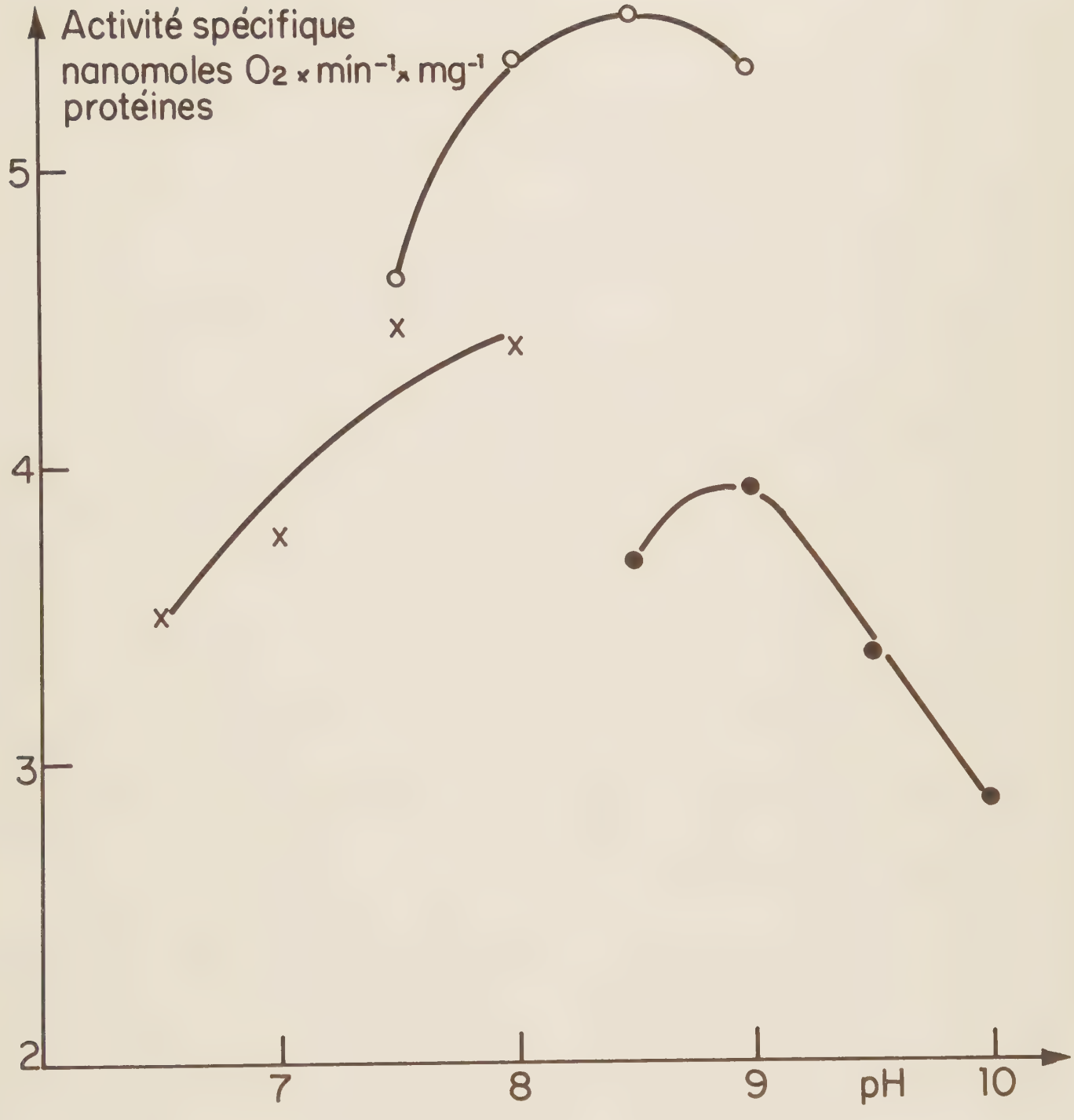


Fig. 4-2. ACTION DU pH SUR L'ACTIVITE DE LA L-AMINOACIDE OXYDASE

—x— TAMPON PHOSPHATE DE SODIUM 0,25 M

—o— TAMPON TRIS 0,25 M

—●— DIETHANOLAMINE 0,1 M

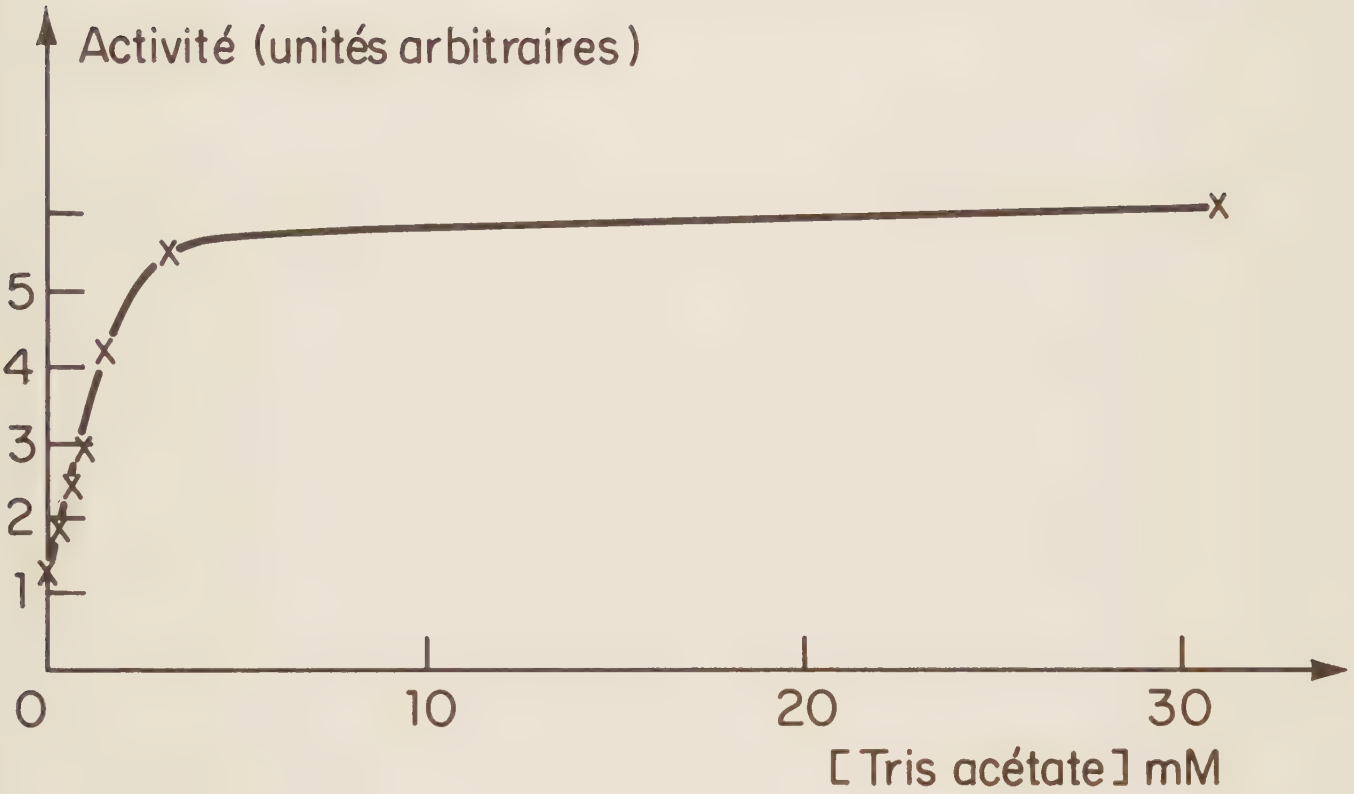


Fig. 4-3. ACTION DE LA MOLARITE DU TAMPON
SUR L'ACTIVITE DE LA L-AMINOACIDE OXYDASE

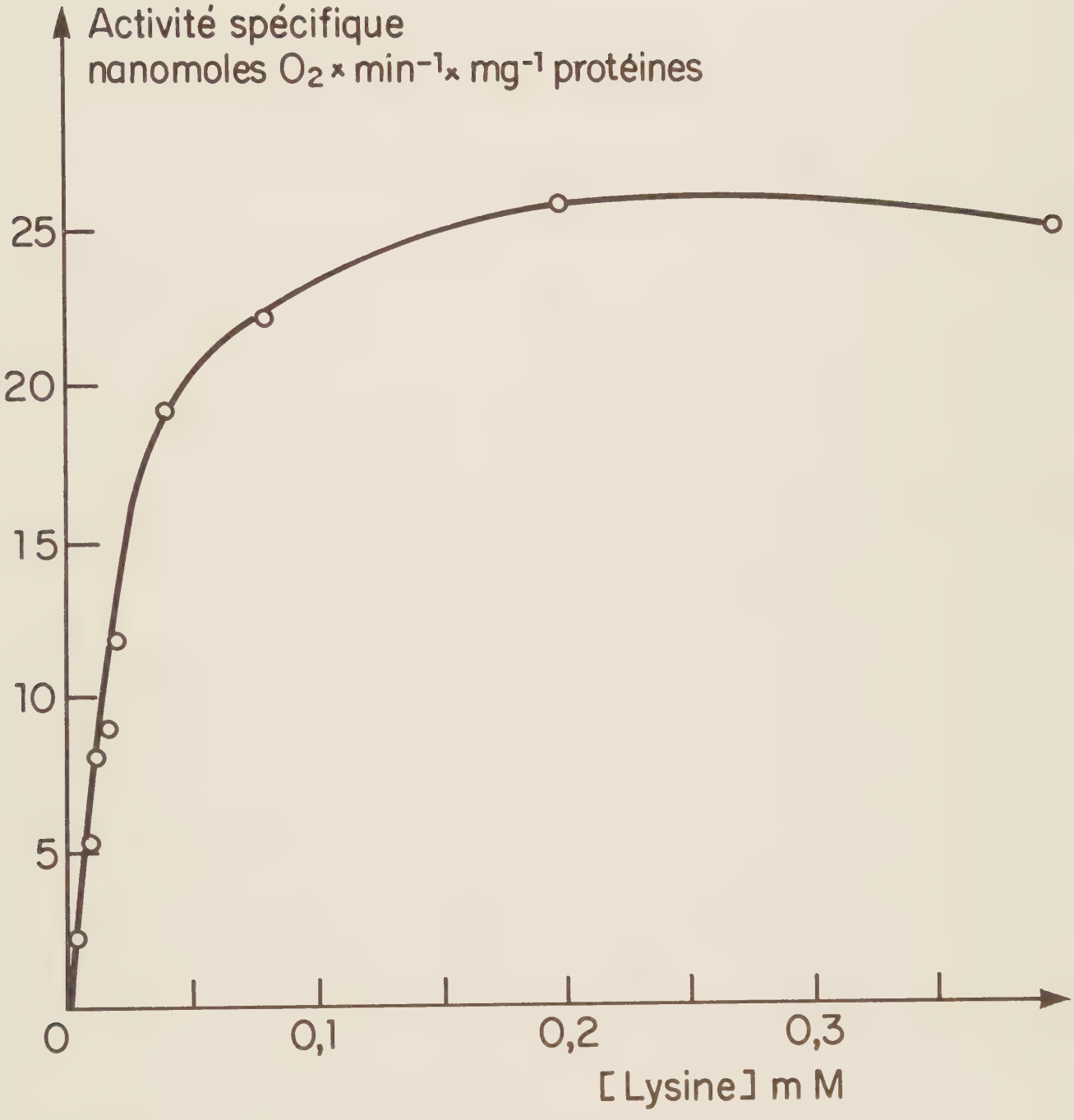


Fig. 4-4. ACTIVITE DE LA L-AMINOACIDE OXYDASE
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN LYSINE

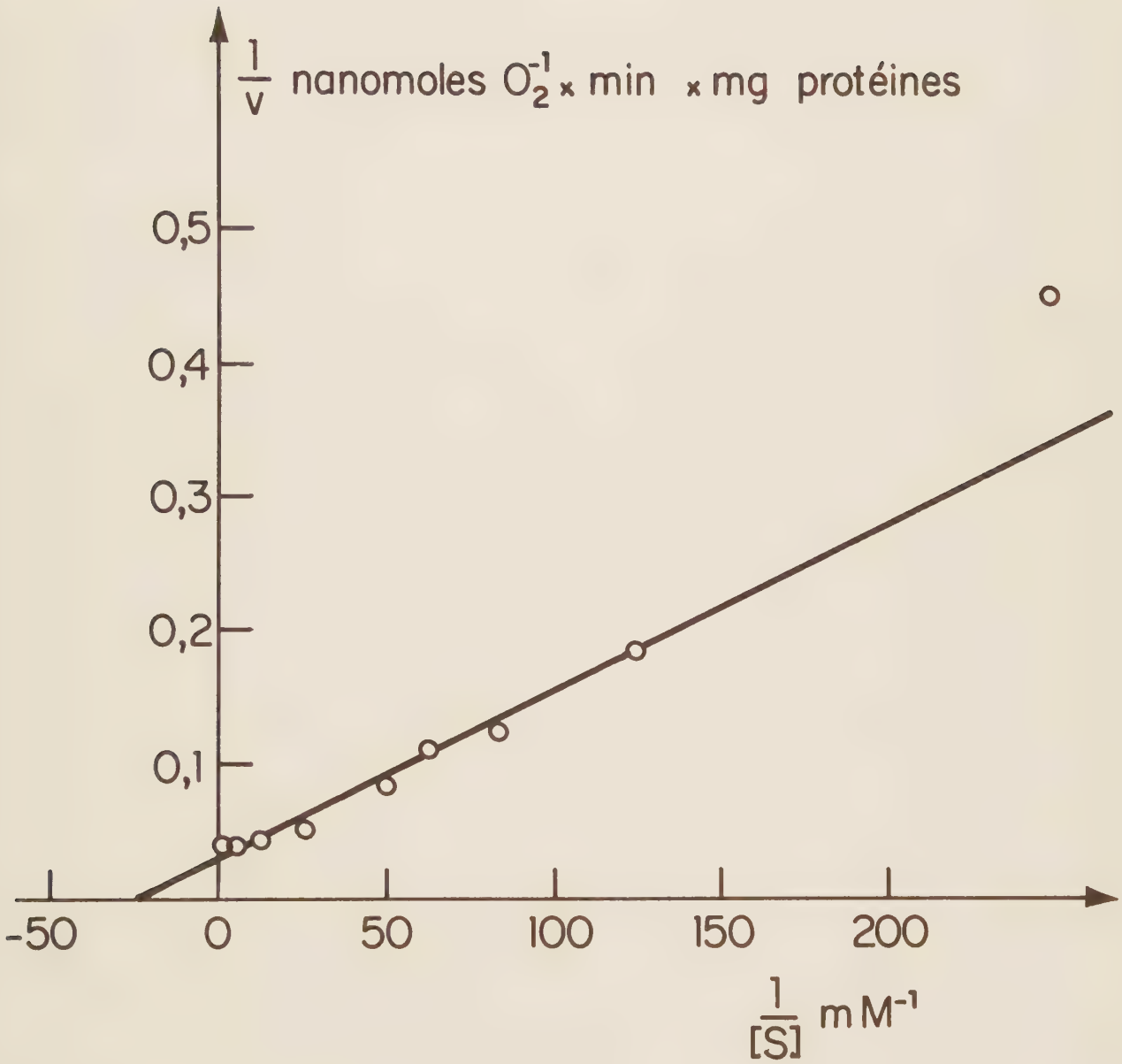


Fig. 4-5. MESURE DU Km DE LA L-AMINOACIDE OXYDASE POUR LA LYSINE
(Km = 4 x 10^{-2} mM)

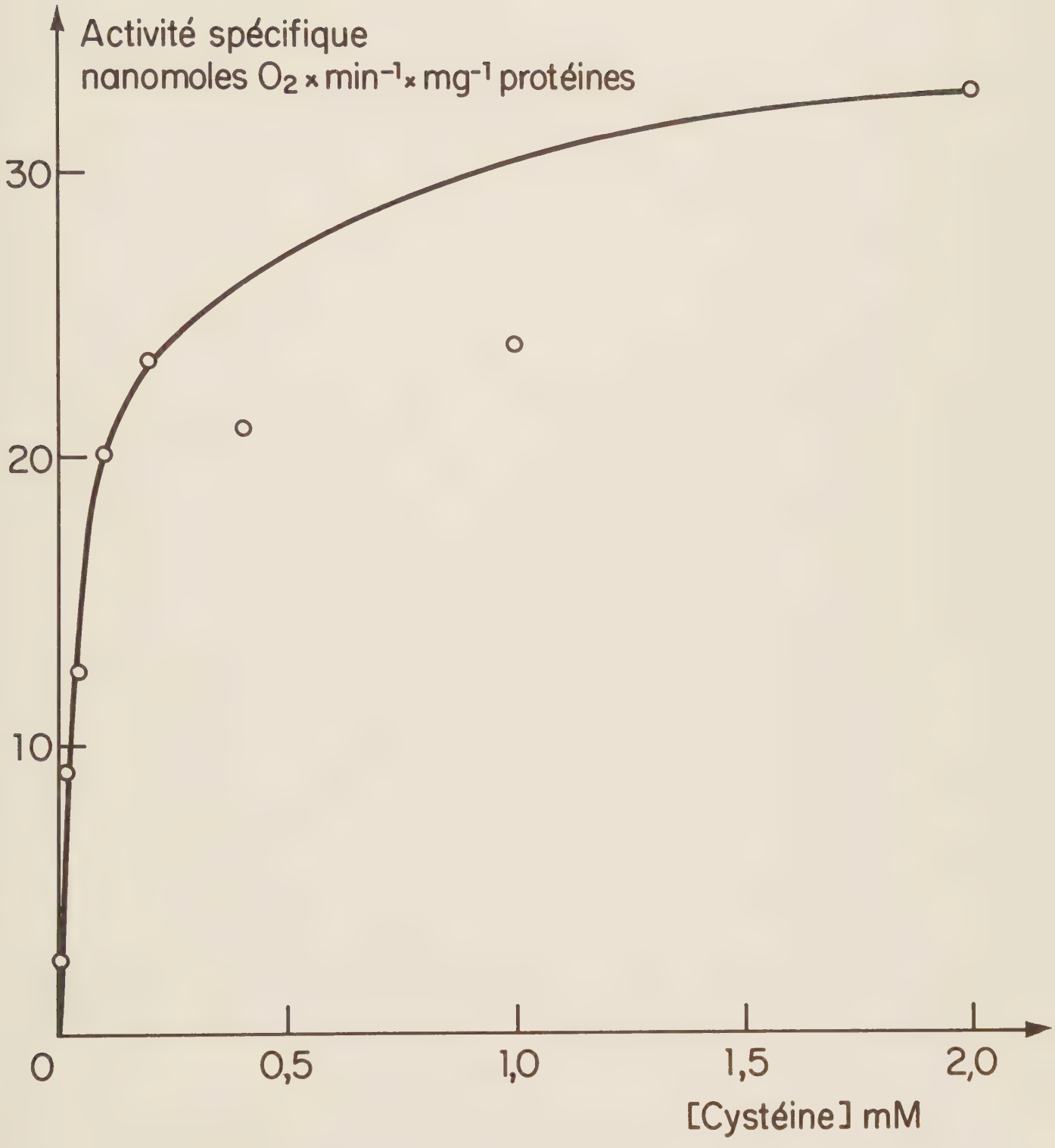


Fig. 4-6. ACTIVITE DE LA L-AMINOACIDE OXYDASE
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN CYSTEINE

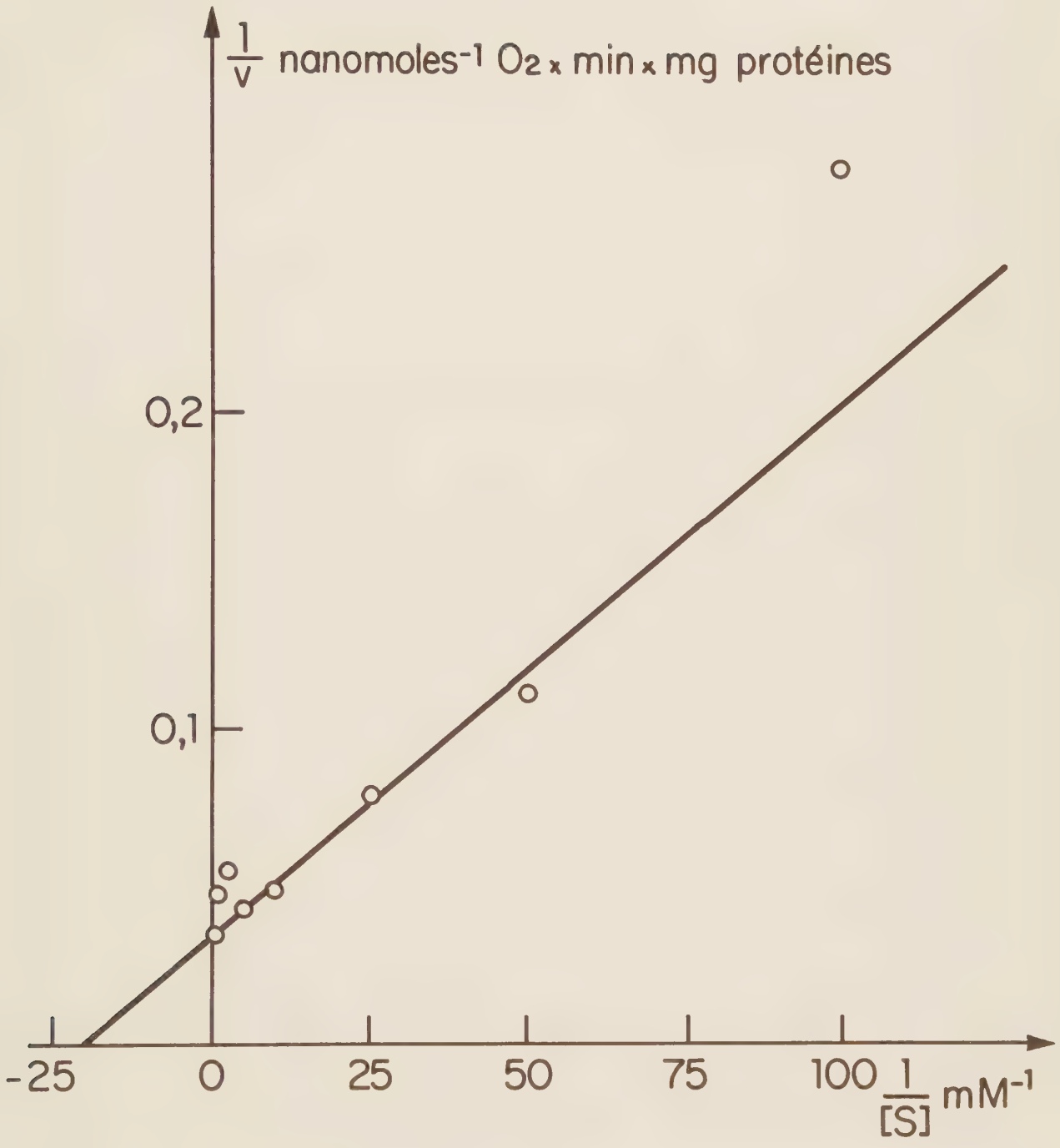


Fig. 4-7. MESURE DU Km DE L'AMINOACIDE OXYDASE POUR LA CYSTEINE
(Km = 5 x 10^{-2} mM)

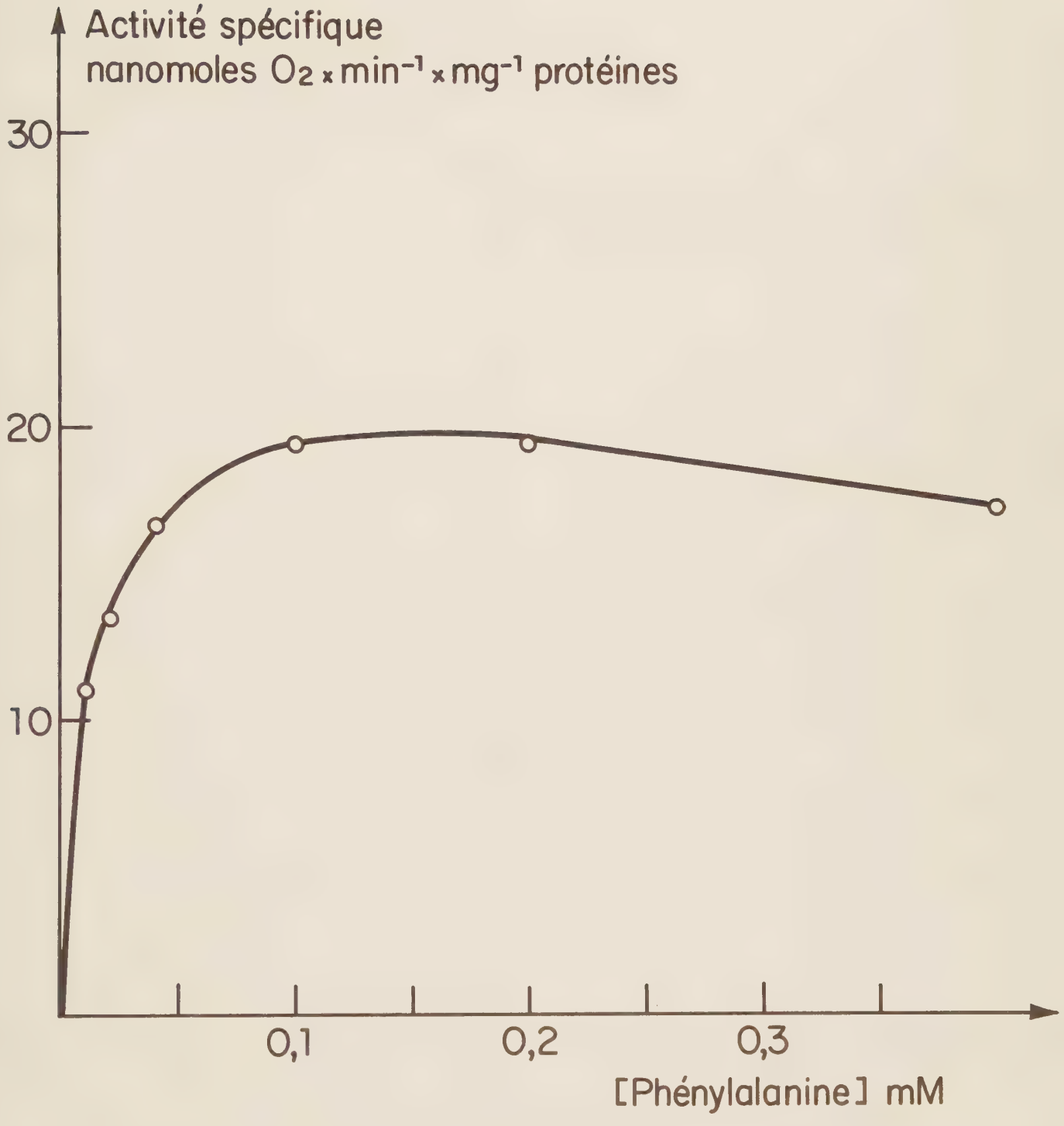


Fig. 4-8. ACTIVITE DE LA L-AMINOACIDE OXYDASE
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PHENYLALANINE

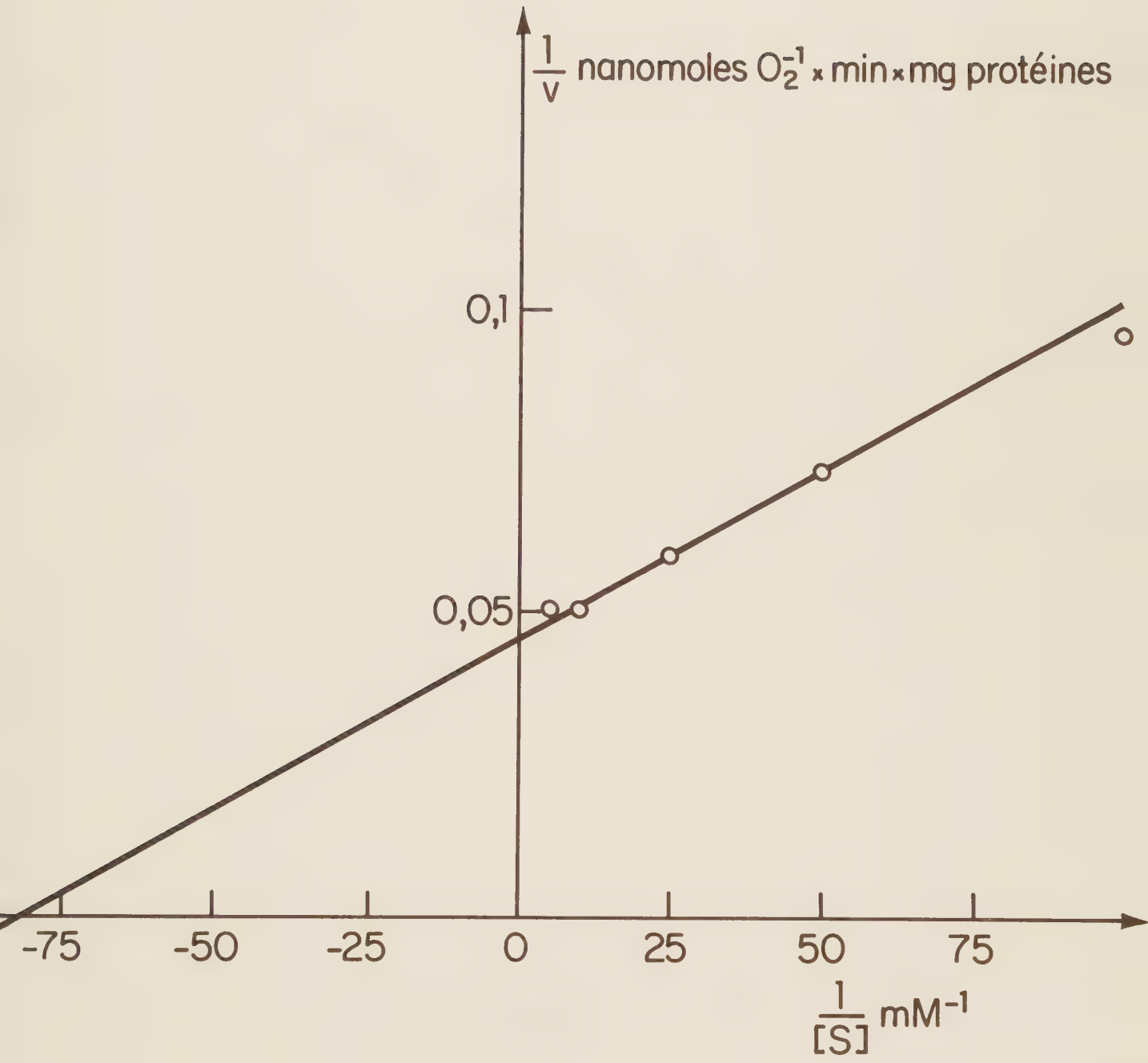


Fig. 4-9. MESURE DU Km DE L'AMINOACIDE OXYDASE POUR LA PHENYLALANINE
(Km = 1,1 x 10^{-2} mM)

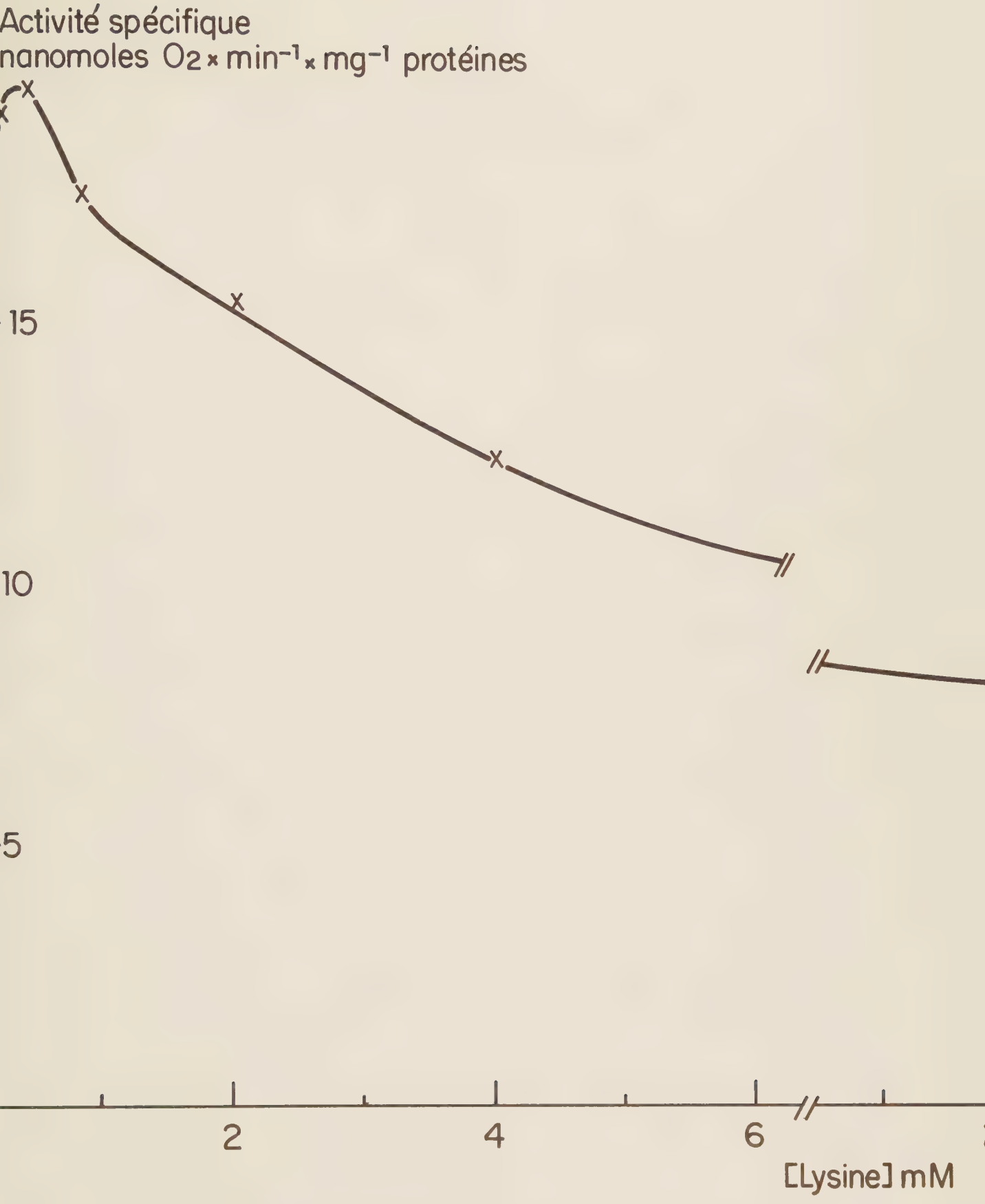


Fig. 4-10. INHIBITION DE L'ACTIVITE L-AMINOACIDE OXYDASE
PAR EXCES DE SUBSTRAT

TABLEAU 4.5

Bilan d'activité de la L-aminoacide oxydase au cours d'une ultracentrifugation de l'extrait brut de A20 (2 h à 155 000 g)

	Activité totale	% d'activité totale
Extrait brut	710	100
Précipité	82	12
Surnageant	548	77

• PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM - A partir d'un extrait frais ultracentrifugé de la souche A20 nous avons tracé la courbe de précipitation des protéines et la courbe de précipitation de la L-aminoacide oxydase par le sulfate d'ammonium à 4°C (Figure 4.11). Nous avons alors décidé de recueillir la fraction de l'extrait précipitant entre 40 % et 80 % de saturation en $(NH_4)_2SO_4$, (fraction 40-80). Le précipité était repris dans le volume (2 ml) nécessaire au passage sur colonne de Sephadex.

• PASSAGE SUR COLONNE DE SEPHADEX G.200 - Selon la méthode décrite page , l'extrait précipité par le sulfate d'ammonium (fraction 40-80) était passé sur une colonne de Sephadex G.200 et élué par un tampon phosphate de potassium 50 mM additionné de chlorure de potassium 0,1 M. Nous avons recueilli des fractions de 1 ml. La courbe d'élution est donnée sur la figure 4.12 . Sur cette courbe on a aussi tracé la courbe d'élution des protéines (par fractions de 3 ml). Dans toutes ces opérations les mesures de protéines ont été effectuées par la méthode de Folin. Nous avons réuni les fractions éluées entre 70 ml et 78 ml (fractions 70-78), les résultats des différentes étapes de cette purification sont donnés dans le tableau 4.6.

TABLEAU 4.6

Purification de la L-aminoacide oxydase

Préparation	Activité spécifique	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	10	-	-
Surnageant d'ultra-centrifugation	13,4	1,34	103
Fractions 40-80 (sulfate d'ammonium)	12,75	1,275	47,5
Fractions 70-78 (Sephadex G.200)	55	5,5	37,8

4.12. ESTIMATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DE LA L-AMINOACIDE OXYDASE

Le passage de l'extrait purifié (fraction 70-78) sur une autre colonne de Sephadex G.200 avec des marqueurs, selon la méthode d'Andrews (73), (74) nous a permis d'estimer la masse moléculaire de cette enzyme.

La fraction que nous avons recueillie après le premier passage sur colonne de Sephadex G.200 a été concentrée par passage à travers une membrane en nitrate de cellulose (Sartorius SM 13200). On a alors ajouté à l'oxydase trois marqueurs qui sont la catalase, la lactate déshydrogénase et l'alcool déshydrogénase dont les provenances ont été précisées plus haut (page 23). On a passé ce mélange d'enzymes (1 ml) sur la même colonne de Séphadex que celle utilisée pour la purification et on a recueilli des fractions de 1 ml. Les activités de la L-aminoacide oxydase, de la catalase, de la lactate déshydrogénase et de l'alcool déshydrogénase ont été mesurées dans chaque fraction ce qui nous a permis de tracer les courbes d'élution de la figure 4.13.

Le volume mort V_o de la colonne étant 50 ml, nous avons calculé pour chaque enzyme V_e/V_o, V_e étant le volume d'élution. Nous avons tracé V_e/V_o en fonction du logarithme de la masse moléculaire, selon Andrews (73) (Figure 4.14). On constate que la catalase ne se situe pas exactement sur la courbe ainsi qu'on peut le noter chez cet auteur (73). Cependant, de cette courbe nous pouvons déduire que la masse moléculaire de la L-aminoacide oxydase est voisine de 130 000-140 000.

4.13. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Nous avons effectué quelques essais avec notre L-aminoacide oxydase et deux L-aminoacides oxydases de venin de serpent : celle de Crotalus adamanteus (Sigma) et celle de Crotalus terr. terr.(Boehringer). Nous avons obtenu ainsi que le décrivent Hayes et Wellner (117) trois bandes d'activité pour l'enzyme de Crotalus adamanteus. Par contre aussi bien pour la L-aminoacide oxydase de Crotalus terr. terr. que celle de Corynebacterium nous n'avons observé que deux bandes.

4.14. ETUDE D'AUTRES SOUCHES

Nous avons cherché si cette L-aminoacide oxydase existait chez d'autres souches, dans les mêmes conditions que chez la souche A20. Nous avons donc cultivé ces souches sur un milieu minimum, où la lysine était la seule source d'azote, ce milieu étant seulement additionné des vitamines nécessaires à certaines souches. Les extraits ont été obtenus de la même façon que pour la souche A20. Nous avons identifié l'oxydase au moyen d'une électrode de Clark, en vérifiant que plusieurs acides aminés étaient substrats, que la présence de catalase divisait l'activité par deux et qu'il y avait inhibition par excès de substrat. Nous avons trouvé cette enzyme chez les deux autres souches étudiées ici, soit 15592 et C91. Des mesures plus

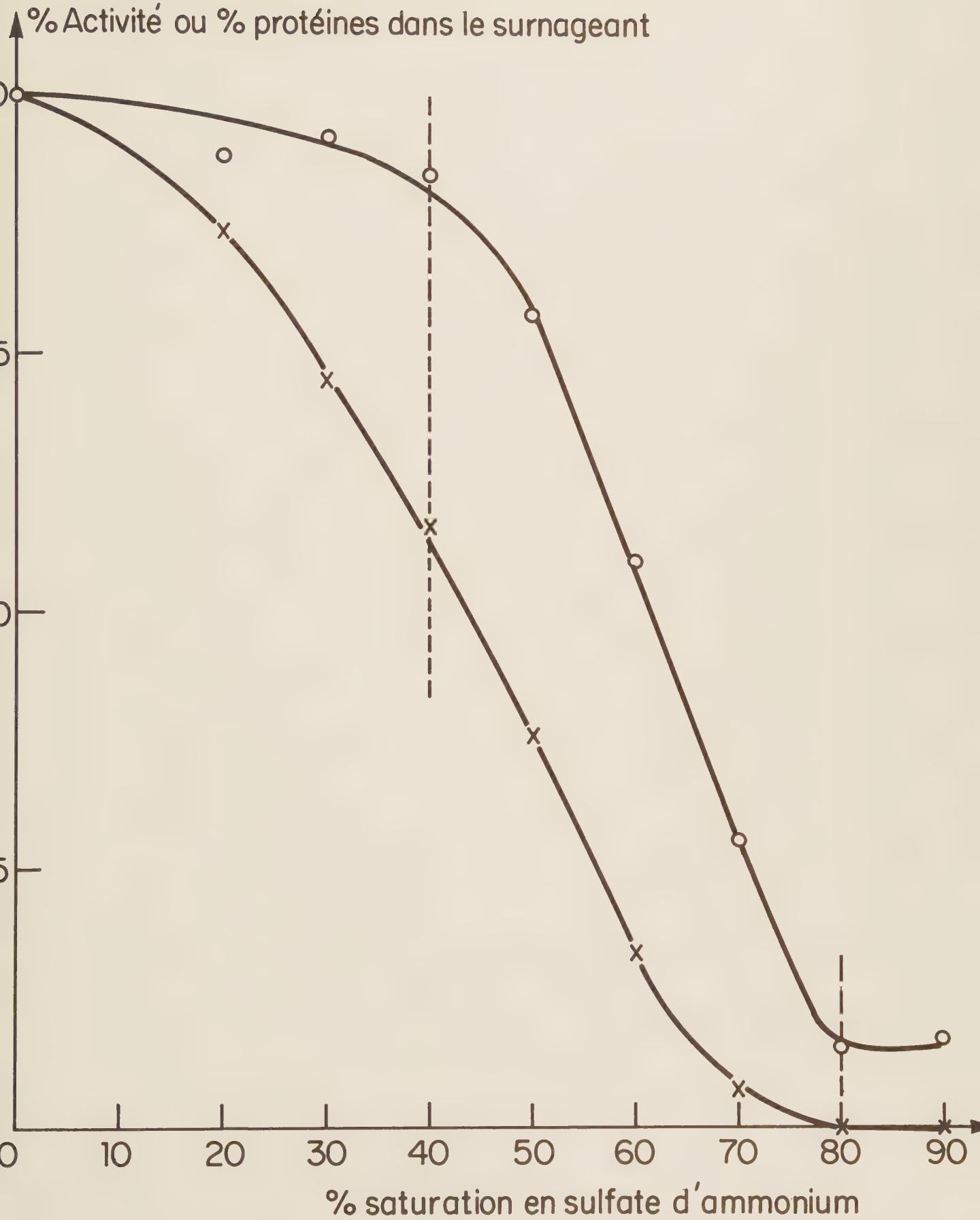


Fig. 4-11. PRECIPITATION D'UN EXTRAIT DE A 20 AU SULFATE D'AMMONIUM

—x— PROTEINES

—o— L-AMINOACIDE OXYDASE

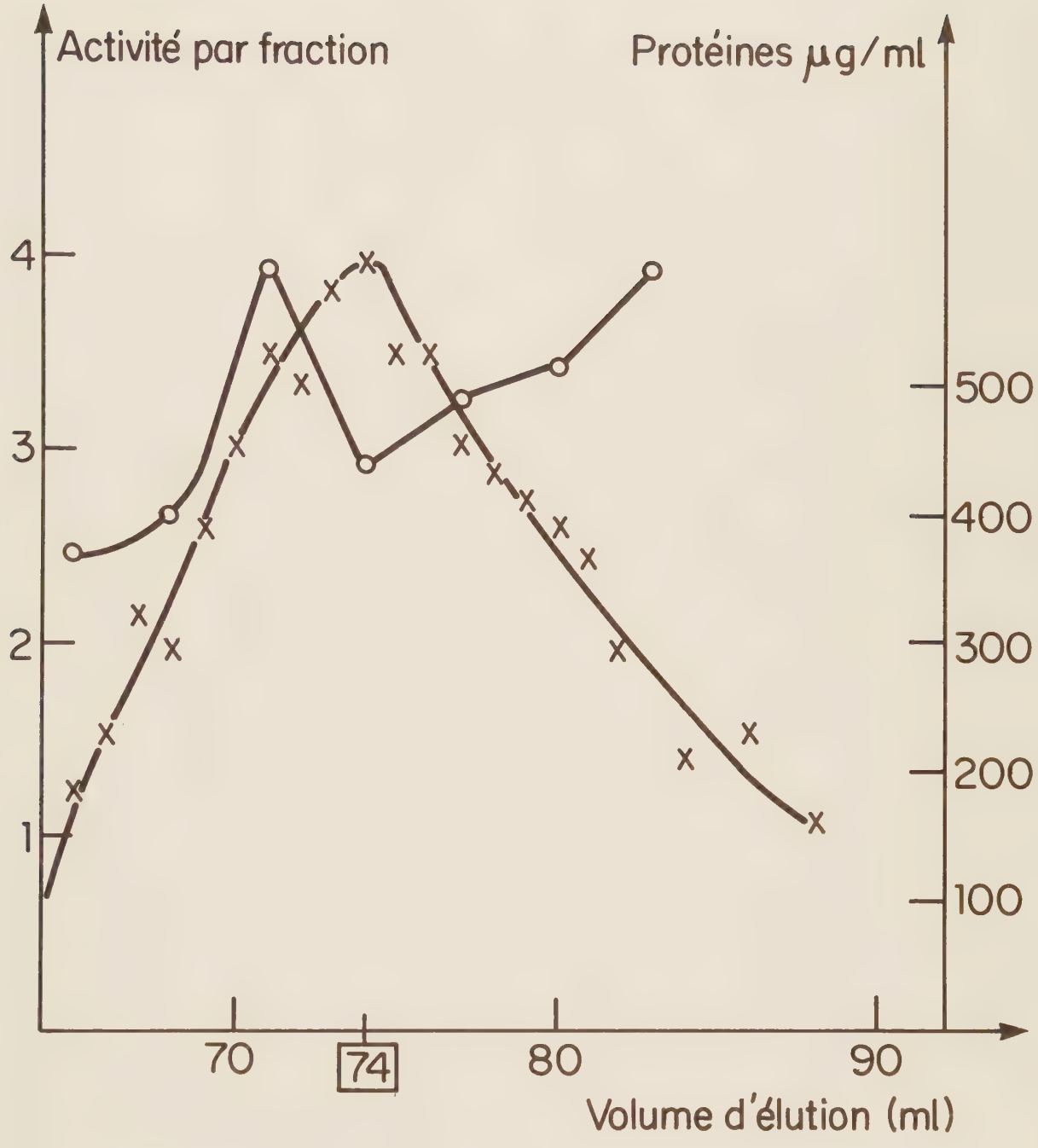


Fig. 4-12. ELUTION DE LA L-AMINOACIDE OXYDASE SUR UNE COLONNE DE SEPHADEX G 200

—X— ACTIVITE

—○— PROTEINES

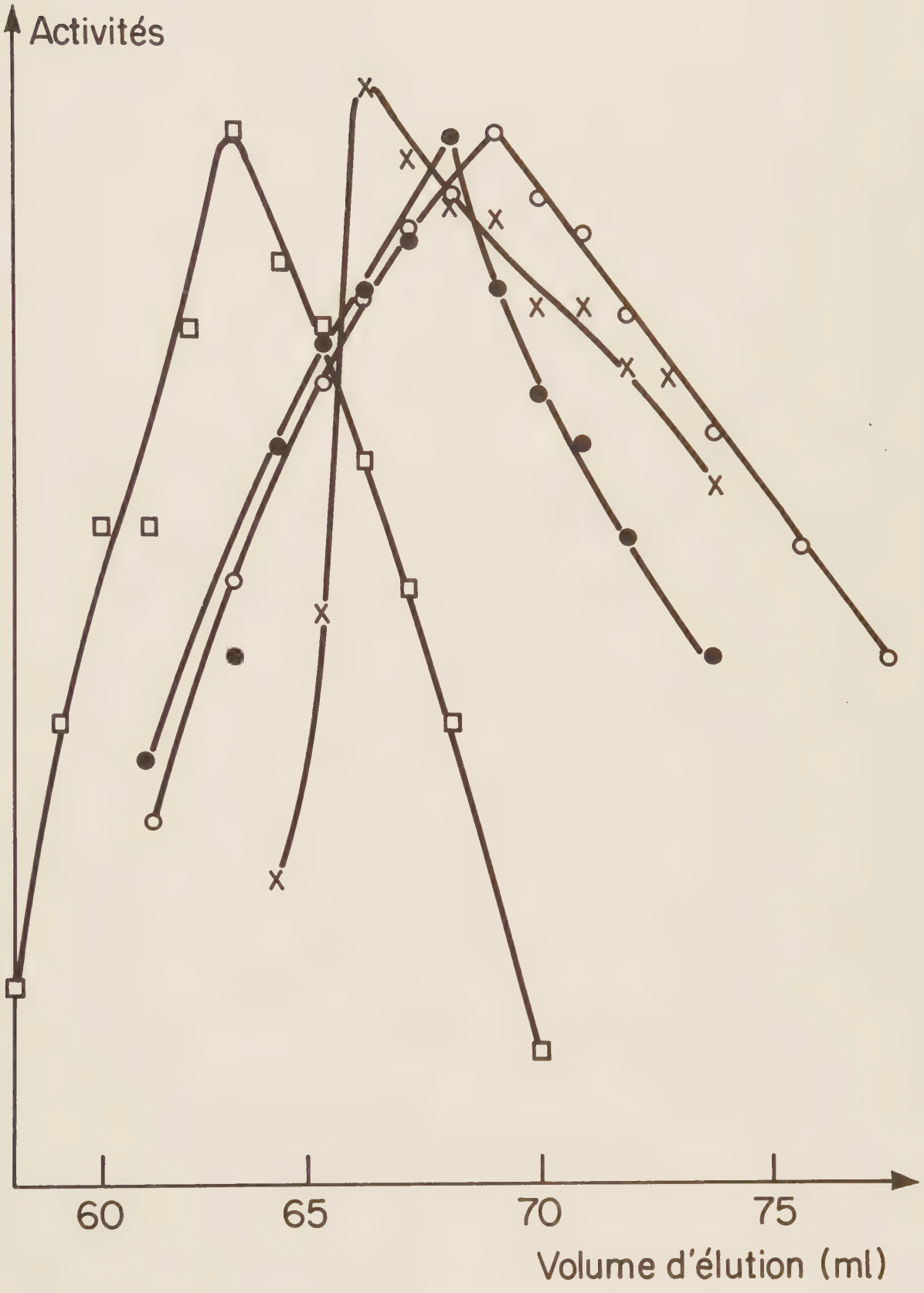


Fig. 4-13. ELUTION DE LA L-AMINOACIDE OXYDASE ET DE MARQUEURS SUR SEPHADEX G 200

—X— ALCOOL DESHYDROGENASE —□— CATALASE

—○— LACTATE DESHYDROGENASE —●— L-AMINOACIDE OXYDASE

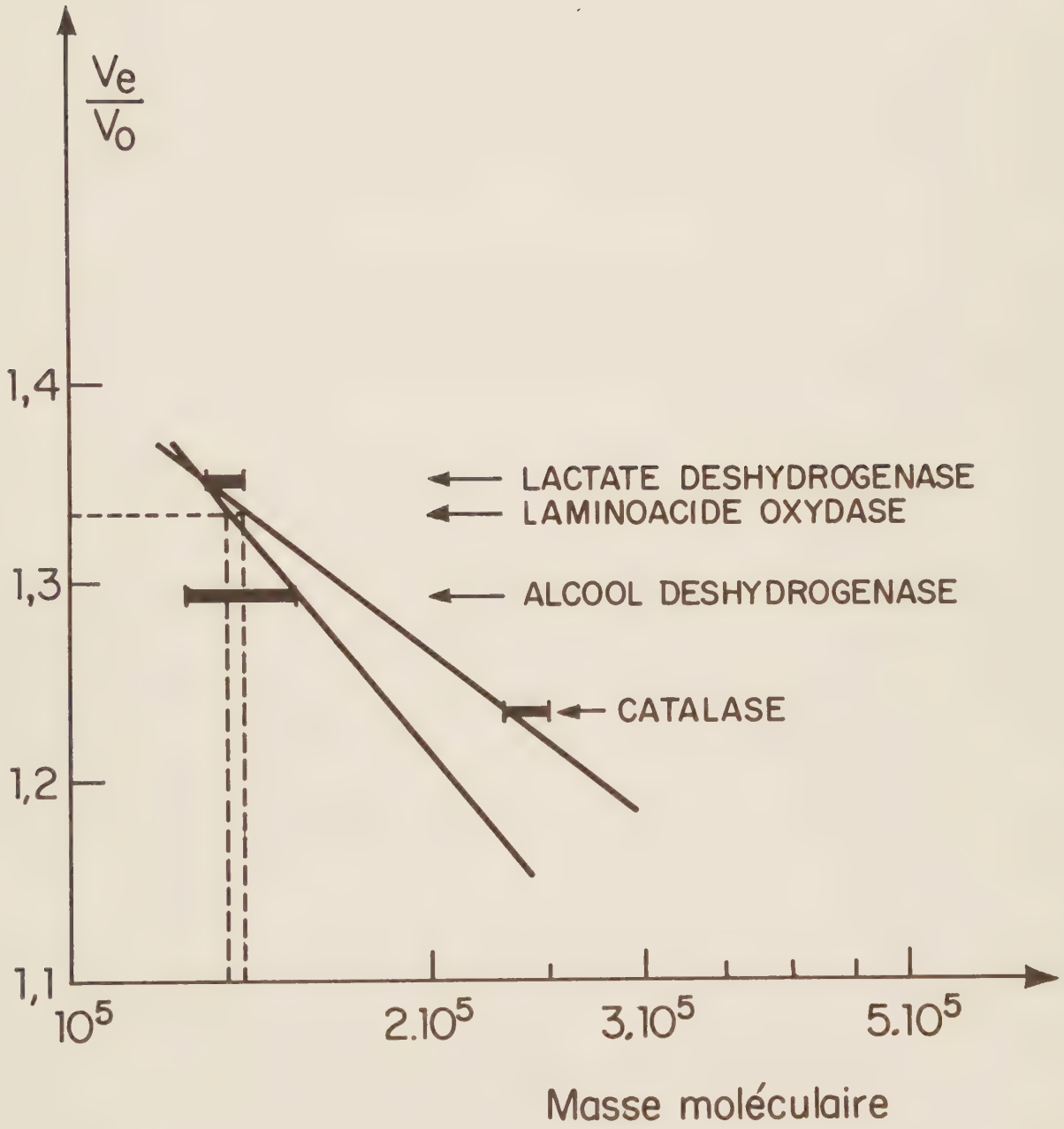


Fig. 4-14. EVALUATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DE LA L-AMINOACIDE OXYDASE

précises chez 15592 nous ont permis de trouver des Km de 2,8 10^{-2} mM pour la lysine et de 3,7 10^{-2} mM pour la cystéine. Les essais positifs ont été obtenus aussi avec Arthrobacter paraffineus, Brévibacterium divaricatum, Micrococcus glutamicus et Mycobacterium rhodochrous. On note cependant que ces trois dernières souches n'utilisent pas seulement la lysine comme source d'azote, mais aussi comme source de carbone. En effet sur un milieu où la lysine sert de source de carbone, il y a une légère croissance pour Brevibacterium divaricatum et pour Micrococcus glutamicus et une croissance normale pour Mycobacterium rhodochrous. Il est donc possible que chez ces souches, la L-aminoacide oxydase ne serve pas uniquement pour l'assimilation de l'azote comme chez les précédentes mais puisse peut être aussi constituer l'étape initiale d'une dégradation plus complète de cet acide aminé.

Chez les Pseudomonas, on a trouvé une lysine oxygénase chez Pseudomonas putida (18), (81)tandis que chez Pseudomonas acidovorans qui ne dégrade pas la lysine, la consommation d'oxygène observée dans les extraits enzymatiques en présence de lysine était nulle. Des essais analogues avec Bacillus subtilis et E. coli n'ont donné aucun résultat dans les conditions utilisées.

4.15. CONCLUSION

En conclusion nous avons donc trouvé chez les Corynebacterium et chez quelques espèces voisines une L-aminoacide oxydase soluble ou tout au moins entièrement solubilisée dans les conditions de préparation des extraits enzymatiques (traitement aux ultra-sons). Elle semble donc différente de toutes les aminoacides oxydases bactériennes décrites jusqu'à présent (57), (59), (60). Par contre, elle se rapproche des L-aminoacides oxydases solubles décrites. Elle présente le phénomène d'inhibition par excès de substrat. Son poids moléculaire de à peu près 130.000 est tout à fait comparable à celui de la L-aminoacide oxydase de venin de serpent. L'étude que nous avons effectuée, bien que sommaire, nous a donc cependant permis de caractériser cette L-aminoacide oxydase.

Cette étude nous a permis de préciser le rôle de cette enzyme dans le métabolisme des souches étudiées. En effet, les caractères d'inductibilité par les aminoacides et de répression par les sels d'ammonium, joints au fait de l'utilisation de la lysine comme source d'azote mais non de carbone par les souches étudiées, indiquent nettement pour cette enzyme un rôle de source d'ions ammonium à partir de L-aminoacides en l'absence d'autres sources d'azote assimilable. La présence de catalase qui permet l'élimination de H_2O_2 formé par la réaction a été également mise en évidence dans les conditions où cette aminoacide oxydase était présente.

Un examen de la présence de la L-aminoacide oxydase chez diverses espèces bactériennes a indiqué qu'elle était localisée plus particulièrement chez diverses espèces qui partagent des caractères communs notamment celles du groupe qui rassemble les genres Corynebacterium, Nocardia, Mycobacterium (groupe CNM) défini par L. Barksdale (130).

En ce qui concerne l'objectif principal de ce travail, le point essentiel mis en évidence par cette étude est que cette L-aminoacide oxydase n'existe pas en présence d'une autre source d'azote qu'un acide aminé puisque dans certaines conditions elle n'est pas synthétisée, notamment, en présence des sels d'ammonium. Nous avons donc montré que la dégradation de la lysine, si elle est susceptible d'exister chez ces souches, peut être également évitée. Il suffit en effet que la source d'azote de la culture soit un sel d'ammonium présent en excès. Ces résultats ne s'opposaient donc pas à l'utilisation de ces souches dans les conditions qui viennent d'être définies en vue de l'excrétion de lysine.

CHAPITRE V

OBTENTION ET ETUDE DE MUTANTS AUXOTROPHES

Les premiers essais concernant d'éventuels mutants excréteurs de lysine ont été consacrés à l'obtention et à l'étude de mutants auxotrophes soit pour la thréonine, soit pour l'homosérine. Ces deux sortes de mutants auxotrophes nécessitent pour leur croissance de la thréonine (ainsi que de la méthionine pour les mutants exigeants en homosérine). En les cultivant avec des quantités limitantes de thréonine, on évite l'inhibition de l'aspartokinase (inhibition par la thréonine seule et surtout inhibition concertée par la lysine plus la thréonine). L'aspartokinase étant, ainsi que nous l'avons vu, la seule enzyme soumise à une régulation pour la biosynthèse de la lysine, ces auxotrophes devraient excréter librement de la lysine. Les auxotrophes pour l'homosérine, étant des mutants sans homosérine déshydrogénase, devraient excréter uniquement de la lysine. Par contre, les mutants thréonine moins ont leur chaîne de biosynthèse de la thréonine coupée entre l'homosérine et la thréonine. Ils pourraient donc excréter non seulement de la lysine, mais aussi de l'homosérine. Ce chapitre sera donc consacré à l'obtention et à l'étude de ces deux sortes de mutants auxotrophes, ainsi qu'à la comparaison entre certains mutants obtenus au laboratoire et un mutant thréonine moins de collection,ATCC 21267 faisait l'objet d'un brevet japonais (61) et obtenu à partir de la souche ATCC 15592, l'une des trois souches de Corynebacterium qui font l'objet de ce travail. Toutes les déterminations d'acides aminés nécessaires à la croissance des mutants étudiés dans ce chapitre ou excrétés par ces derniers ont été faites par un analyseur d'acides aminés, sauf précision contraire.

5.1. OBTENTION DE MUTANTS AUXOTROPHES

Nous avons essayé d'obtenir des mutants exigeants en thréonine et des mutants exigeants en homosérine à partir des trois souches étudiées. Comme nous l'avons vu dans les méthodes (page 21) il a fallu faire agir des agents mutagènes et isoler les mutants obtenus sans crible. Il est évident que pour repérer un mutant auxotrophe au milieu d'une population sauvage sans moyen de sélection, il faut faire un nombre d'étalements et de répliques considérable. Ce manque de crible est probablement la cause des difficultés rencontrées au cours des différentes mutagénèses et du petit nombre de mutants finalement isolés. Tous les mutants isolés l'ont été en utilisant le même agent mutagène, le NMU. Des mutagénèses avec d'autres agents mutagènes tels que le NG, l'EMS ou les rayons ultraviolets ne nous ont pas donné les mutants recherchés dans les conditions dans lesquelles nous les avons employés. En conclusion, donc, nous avons obtenus au cours de mutagénèses différentes: un mutant homosérine moins de la souche A2O, A2OH5, et 4 mutants thréonine moins de la souche 15592, appelés 15592T9, 15592T1O, 15592T3 et 15592T11.

Nous avons aussi obtenu chez les trois souches des mutants méthionine moins que nous avons isolés mais sur lesquels aucune étude n'a été entreprise.

5.2. ETUDE DU MUTANT HOMOSERINE MOINS A2OH5

5.2.1. CARACTERISATION DE CE MUTANT

A2OH5 a été isolé après mutagénèse par le NMU par répliques d'une boite de Pétri contenant de la méthionine et de la thréonine sur deux boites de Pétri contenant l'une seulement de la méthionine et l'autre seulement de la thréonine : A2OH5 ne poussait sur aucune de ces répliques. A2OH5 était conservé sur tubes de milieu solide gélosé additionné des facteurs de croissance et repiqué régulièrement. A chaque repiquage, le mutant était purifié par la même méthode des répliques qui avait servi à l'isoler. En effet, nous avons observé que ce mutant réversait assez fréquemment, ce qui rendait nécessaire ces purifications.

Nous avons essayé de déterminer qu'il s'agissait bien d'un mutant homosérine moins et non pas d'un double mutant méthionine moins, thréonine moins. La chaine de biosynthèse d'un double mutant thréonine moins et méthionine moins serait coupée en deux endroits entre l'aspartate semi-aldéhyde et la thréonine d'une part et entre l'aspartate semi-aldéhyde et la méthionine d'autre part. Par conséquent, même en lui fournissant de l'homosérine, il ne pourrait se développer puisqu'il serait incapable de synthétiser à partir de cette dernière soit la thréonine, soit la méthionine, soit les deux. Le mutant A2OH5 pousse normalement sur un milieu minéral additionné d'homosérine. C'est donc un mutant homosérine moins. Dans ces conditions, la seule enzyme théoriquement absente est l'homosérine déshydrogénase. Nous avons fait un extrait enzymatique du mutant A2OH5 cultivé en présence de méthionine et de thréonine et nous avons mesuré l'activité de l'homosérine déshydrogénase ainsi que l'activité de l'aspartokinase. Les résultats sont donnés dans le tableau 5.1 en comparaison avec les activités des enzymes de la souche sauvage. Cela permet de conclure définitivement à l'absence d'homosérine déshydrogénase chez le mutant A2OH5.

TABLEAU 5.1

Comparaison entre les activités enzymatiques de l'homosérine déshydrogénase et de l'aspartokinase chez A2O et le mutant A2OH5

Souche	Aspartokinase nanomoles x mn^{-1} x mg^{-1}	Homosérine déshydrogénase nanomoles x mn^{-1} x mg^{-1}
A2O	12,5	14,5
A2OH5	11,1	0,0

5.2.2. LIMITATION DE LA CROISSANCE DU MUTANT A2OH5 PAR LA QUANTITE DE THREONINE DANS LE MILIEU DE CULTURE

Il est évident que pour obtenir une excrétion de lysine par le mutant, il ne faut pas que la thréonine soit en excès dans le milieu de culture car il en résulterait une inhibition concertée de l'aspartokinase par cette thréonine plus la lysine excrétée, ce qui naturellement limiterait l'excrétion. Nous avons donc cherché quelles étaient les concentrations limitantes de thréonine pour la croissance de A2OH5, tout en obtenant une biomasse la plus importante possible. Nous avons tracé des courbes de croissance de A2OH5 en fonction de la thréonine présente dans le milieu de culture . Cependant, d'autres facteurs limitent eux aussi la croissance ; en particulier, la croissance est différente dans des erlenmeyers de 100 ml, dans des fioles de Fernbach ou dans un fermenteur. De plus, le pH joue un rôle primordial.

Les courbes que nous avons tracées l'ont été en cultivant A2OH5 dans des fioles de 100 ml sans régulation de pH. Dans ces fioles, la croissance est d'autant plus vite limitée que le pH n'est pas régulé. La concentration de thréonine limitant la croissance est faible (1 mM par exemple). Mais dans les cultures en fioles de Fernbach, ou en fermenteur, la biomasse obtenue peut être beaucoup plus forte et donc la quantité de thréonine limitante pourra être beaucoup plus élevée que celle citée plus haut. Ceci démontre l'importance des facteurs liés à la méthode de culture utilisée, essentiellement le pH et l'aération qui sont susceptibles de constituer dans certains cas les facteurs limitants de la croissance. De plus, il est évident, quel que soit le type de culture employé, qu'une limitation réelle par la thréonine ne peut être obtenue que si les constituants du milieu tels que les composants minéraux, le substrat, la source d'azote pour ne citer que les plus importants ne sont pas limitants. Pour avoir des courbes de limitation de croissance directement utilisables pour les essais d'excrétion de lysine effectués par la suite, il aurait fallu tracer des courbes de limitation de la croissance par la thréonine dans toutes les conditions de culture que nous avons utilisées (principalement fioles de Fernbach). Mais, cela était particulièrement délicat dans le cas où le substrat utilisé était un substrat non soluble, l'hexadécane. En effet, il est alors impossible de suivre la croissance de la souche par mesure de l'absorbance du milieu de culture. De plus, la présence d'une suspension de carbonate de calcium, utilisée pour la régulation du pH dans les essais d'excrétion en fioles de Fernbach rendait encore plus aléatoire la mesure de la croissance dans ces conditions. Devant la complexité du problème, il est apparu qu'il existait un critère simple permettant d'affirmer que la culture avait été limitée en thréonine : il suffisait de vérifier qu'en fin de croissance, il ne restait plus de thréonine dans le milieu de culture ou mieux, de suivre au cours de la croissance la diminution de la concentration en thréonine.

5.2.3. EXCRETION DE LYSINE PAR LE MUTANT A2OH5

• Détermination qualitative de l'excrétion - Selon la méthode décrite page nous avons répliqué le mutant A2OH5, sur une boite de Pétri en présence de la bactérie indicatrice de lysine EC432. Nous n'avons observé aucune auréole autour des colonies A2OH5. Cela signifie qu'il n'y a pas d'excrétion de lysine (cette excrétion aurait permis à EC432 de se développer) dans ces conditions. Malgré ce résultat peu encourageant, des essais de culture en fioles ont été réalisés.

• Cultures en fioles de Fernbach - Des cultures ont été réalisées dans des fioles de Fernbach contenant du milieu J, de la méthionine 4 mM, de l'hexadécane 5 %, du carbonate de calcium 2 %, et diverses concentrations de thréonine. La fiole de Fernbach était ensemmencée directement à partir d'un tube afin d'éviter une préculture qui aurait favorisé l'apparition de révertants. Le carbonate de calcium (61) était destiné à une régulation sommaire du pH, c'est-à-dire à éviter une trop forte baisse de pH. De plus, le pH était ramené tous les jours à 6,8 par l'ammoniaque normale.

TABLEAU 5.2

Excrétion de lysine par le mutant A2OH5

(mesurée par chromatographie liquide sur analyseur d'acides aminés)

Thréonine ajoutée pour la croissance	Thréonine présente dans le milieu au bout de 6 jours	Lysine excrétée en mg/l
0,5 mM	0,00 mM	32 mg en 6 jours 62 mg en 9 jours
2 mM	0,00 mM	242 mg en 6 jours
4 mM	0,05 mM	I04 mg en 6 jours 293 mg en 9 jours

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 5.2. On constate d'abord que dans les trois cas la culture a été limitée en thréonine, et que toujours dans les trois cas, il y a eu excrétion de lysine. La souche sauvage cultivée dans les mêmes conditions donne moins d'un mg de lysine en 7 jours. Nous pouvons faire aussi les remarques suivantes :

- Comme on l'a déjà signalé, l'hexadécane étant un substrat non soluble, il n'existe pas de méthode simple pour mesurer la croissance de la culture (impossibilité de suivre l'absorbance et problème d'homogénéité du milieu). Il serait possible de mesurer au cours du temps la croissance soit par mesure des poids secs, soit par détermination des protéines.

C'est une mesure qui serait indispensable dans une étude plus poussée du mutant, mais qui n'a pas été utilisée pour ces essais préliminaires. En fait, nous avons constaté une forte baisse de pH pendant les trois premiers jours (baisse de 6,8 à 5,4 en 24 heures), puis le pH se stabilisait et ne variait presque plus. Celà nous permet de supposer que la culture pousse pendant les trois premiers jours et qu'elle reste ensuite en phase stationnaire.

- L'excrétion de lysine a lieu pendant la phase stationnaire et il est remarquable de constater qu'au 9ème jour de culture, le maximum n'est pas évidemment atteint.

- On trouve dans le milieu de culture d'autres acides aminés excrétés. En particulier, l'analyse complète du milieu de culture sur l'analyseur d'acides aminés nous a permis de découvrir une excrétion d'acide diaminopimélique non négligeable. On remarque aussi sur le spectre total deux pics importants non identifiables comme des acides aminés usuels.

• Culture en fermenteur - Nous avons utilisé un fermenteur de 2 litres Biotec, contenant du milieu J, de l'hexadécane 5 %, de la méthionine 4 mM et de la thréonine 4 mM. Le fermenteur était ensemencé par 400 ml de suspension bactérienne obtenue par culture en fiole de Fernbach dans les conditions décrites au paragraphe précédent pendant 48 h. Le pH était régulé à 6,8 par une solution d'ammoniaque 2N. Nous avons suivi la croissance de la culture par la consommation d'ammoniaque d'une part et par des mesures de poids secs d'autre part (figure 5.1). Cependant, cette dernière méthode n'a pu être appliquée qu'en début de culture. En effet, les cellules tendent, à partir d'un certain moment (en fin de phase exponentielle), à s'agglomérer sur les parois du fermenteur et la teneur en cellules des prises d'essai n'est plus représentative de celle réellement présente dans le fermenteur.

Des analyses complètes d'acides aminés ont été effectuées sur des prises d'essais s'échelonnant tout au long de la fermentation. Nous avons d'abord pu suivre la disparition de la thréonine et de la méthionine nécessaires à la croissance du mutant (figure 5.1). Nous avons obtenu une excrétion de plusieurs acides aminés : de l'acide glutamique, de la lysine et de l'acide diaminopimélique ainsi que deux produits non identifiés. Tous ces produits excrétés ont été mesurés quantitativement sur un analyseur d'acides aminés. Cependant, une incertitude reste sur les dernières mesures à cause d'une contamination du fermenteur au cours des dernières heures de la culture. Sur la figure 5.1, on a tracé les courbes d'excrétion de lysine et d'acide diaminopimélique. L'acide glutamique est apparu très tôt au cours de la culture, est passé par un maximum (1,5 mmoles/l) à la fin de la phase exponentielle puis a diminué pour presque disparaître en fin de culture. L'excrétion d'une faible quantité d'acide glutamique peut être considérée comme normale puisque la souche sauvage A20 est excrétrice d'acide glutamique.

Enfin, nous avons noté l'excrétion de deux produits, l'un en faible quantité, l'autre en quantité non négligeable (une détermination approximative donnait une quantité maximum de 6 à 7 mmoles/l). Le produit présent en faible quantité donne à l'analyseur d'aminoacides un pic complétement superposable à celui de l'acide α-aminoadipique. Ce composé serait susceptible d'être formé lors de la dégradation de la lysine par une chaîne de réactions commençant par l'obtention du cétoacide à l'aide de la L-aminoacide oxydase. On sait que cette oxydase n'existe pas en présence d'un excès d'ammoniaque. On peut donc supposer qu'en maintenant dans le réacteur un excès d'ammoniaque jusqu'au bout de la culture, ce produit serait présent en quantité négligeable. Par contre, le produit le plus important n'a pas été identifié jusqu'à présent. On sait seulement que ce produit interfère certainement dans le dosage colorimétrique de la lysine ; en effet, on trouve par cette méthode des quantités de lysine bien supérieures à celles trouvées par l'analyseur d'acides aminés, même en tenant compte de l'acide diaminopimélique présent dans les échantillons. Après passage de ces échantillons sur une colonne de résine échangeuse de cations (Bio-Rad AG50W-X8) nous lui avons fait subir une hydrolyse acide (24 h. à 100° dans HCl 6 N). L'analyse de l'échantillon ainsi traité par le JEOL révélait la disparition du produit initial et l'apparition d'une quantité de lysine du même ordre de grandeur.

5.3. ETUDE DES MUTANTS EXIGEANTS EN THREONINE

5.3.1 CARACTERISATION DE CES MUTANTS

Tous les mutants exigeants en thréonine ont été obtenus à partir de la souche 15592. Ces mutants ont été repérés par des répliques sur des boites de Pétri ne contenant pas de thréonine sur lesquelles ils ne se développaient pas. Nous les avons isolés en les repiquant sur tubes de milieu gélosé, puis purifiés par la même méthode de répliques.

Ces mutants n'ayant besoin pour pousser que d'un seul aminoacide, la thréonine, ce sont des mutants thréonine moins. Leur chaîne de biosynthèse de la thréonine doit être bloquée entre l'homosérine et la thréonine. Ces mutants sont donc bien caractérisés par leur besoin en thréonine, mais leur identification au niveau des enzymes mises en cause n'a pas été effectuée.

5.3.2. LIMITATION DE LA CROISSANCE DES MUTANTS THREONINE MOINS PAR LA QUANTITE DE THREONINE PRESENTE DANS LE MILIEU DE CULTURE

Comme pour le mutant A2OH5, nous avons tracé des courbes de limitation de la croissance des divers mutants exigeants en thréonine par la thréonine. Ces courbes ont été tracées sur des cultures faites en fioles de 100 ml sans régulation de pH et ne peuvent donc être utilisées que pour des cultures faites dans ces conditions ainsi qu'on l'a expliqué à propos des essais concernant le mutant A2OH5. La limitation en thréonine chez les cultures de ces mutants a été mise en évidence en vérifiant l'absence de thréonine à la fin des cultures des mutants thréonine moins, ou mieux encore, nous avons essayé de suivre la disparition de cet aminoacide au cours de la culture.

5.3.3. EXCRETION DE LYSINE ET D'HOMOSERINE PAR LES MUTANTS EXIGEANTS EN THREONINE ET EN PARTICULIER PAR LE MUTANT 15592 T11

• Détermination qualitative de l'excrétion - Comme pour A2OH5, il n'a pas été possible de mettre en évidence une excrétion de lysine par ces mutants thréonine moins par la méthode des répliques sur bactéries indicatrices de lysine. Nous avons malgré tout testé ces mutants en les cultivant dans des fioles de Fernbach.

• Cultures en fioles de Fernbach - Ces mutants ont été cultivés en fioles de Fernbach et l'on a testé l'excrétion de lysine et d'homosérine selon les condition de culture. Les résultats concernant l'excrétion de lysine par ces mutants ont confirmé les résultats de la détermination qualitative. Nous n'avons jamais quelles que soient les conditions de culture utilisées, décelé d'excrétion de lysine par ces souches. Par contre, nous avons obtenu une excrétion d'homosérine, variable selon les mutants et les conditions utilisées. Il semble qu'en utilisant le glucose comme substrat de croissance, l'homosérine n'est excrétée dans le milieu de culture qu'à l'état de traces. Des résultats plus positifs ont été obtenus en utilisant l'hexadécane comme substrat. Le tableau 5.3 donne l'excrétion des quatre mutants cultivés sur du milieu R additionné de 1% d'hexadécane, de thréonine 0,3 mM et de thiamine (1mg/l).

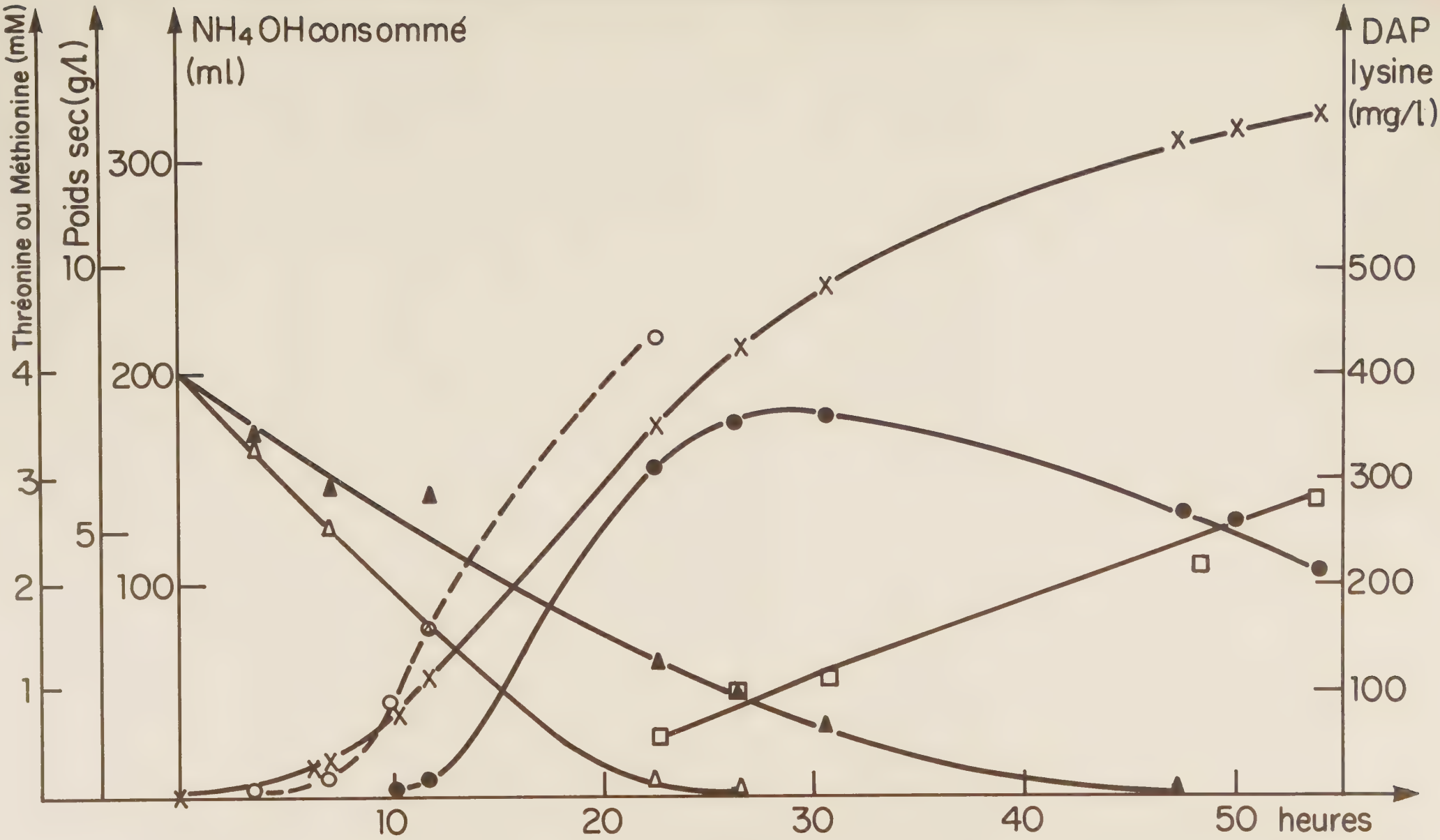


Fig. 5-1. CULTURE DU MUTANT A2OH5 EN FERMENTEUR :

—X— CONSOMMATION NH_4OH —▲— CONSOMMATION METHIONINE

—O— POIDS SECS —●— EXCRETION DAP

—Δ— CONSOMMATION THREONINE —□— EXCRETION LYSINE

TABLEAU 5.3

Excrétion d'homosérine par les différents mutants exigeants en thréonine

Mutant	Homosérine mg/l	Temps de culture
15592 T3	35	2 jours
15592 T9	64	2 jours
15592 T10	49	3 jours
15592 T11	169	2 jours
	447	4 jours

Les résultats encourageants obtenus avec le mutant 15592 T11 nous ont conduit à le tester dans d'autres conditions. En particulier, nous l'avons cultivé dans les conditions données par le brevet japonais (61) étudié dans le paragraphe suivant. Nous avons cultivé ce mutant 15592 T11 sur milieu J additionné de 5 % d'hexadécane, de thréonine 2 mM et de thiamine (1 mg/l). La production d'homosérine dans ces conditions a atteint 1,73 g/l. Sur la figure 5.2 nous avons tracé la courbe d'excrétion d'homosérine et la courbe de disparition de la thréonine en fonction du temps.

5.3.4. ETUDE D'UN MUTANT EXIGEANT EN THREONINE DE COLLECTION ATCC 21267

Le mutant de collection ATCC 21267 est un mutant exigeant en thréonine de la souche japonaise de Corynebacterium ATCC 15592, obtenu par traitement aux radiations ultraviolettes, qui, comme nous l'avons déjà signalé, fait l'objet d'un brevet (61). Ce mutant est un mutant de la même espèce que ceux obtenus au laboratoire et il nous a semblé intéressant de vérifier les données du brevet à titre de comparaison entre les performances du mutant breveté et celles du mutant 15592 T11.

Le mutant ATCC 21267 a été cultivé en fioles de Fernbach sur du milieu J additionné de thiamine 1 mg/l, de thréonine 6,7 mM, de carbonate de calcium 2 % et d'hexadécane 5 %. Dans ces conditions, nous n'avons jamais décelé d'excrétion de lysine alors que le brevet annonçait une excrétion de 3 g/l. Par contre, nous avons trouvé dans le milieu de culture des quantités importantes d'homosérine dépassant dans certains cas 3 g/l. La figure 5.3 montre la disparition de la thréonine et l'excrétion d'homosérine en fonction du temps au cours d'une culture de ATCC 21267.

Des essais ont été effectués en faisant varier la quantité de thréonine présente dans le milieu de culture. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 5.4.

TABLEAU 5.4

Excrétion d'homosérine par le mutant ATCC 21267
en fonction de la quantité de thréonine présente dans
le milieu de culture (au bout de 6 jours)

Thréonine (mM)	Homosérine excrétée (g/l)
6,7	3,2
5,04	3,05
3,36	3,15
1,68	2,1
0,84	1,6

On constate que au-delà d'une certaine concentration en thréonine (3 mM), l'homosérine excrétée n'augmente plus. On pourrait penser que si on augmentait encore la quantité de thréonine présente dans le milieu de culture jusqu'à ce qu'elle ne soit plus limitante, il n'y aurait plus d'excrétion d'homosérine.

On a remarqué que l'excrétion d'homosérine commençait lorsque la thréonine présente dans le milieu était épuisée (figure 5.3), c'est-à-dire lorsque la croissance était limitée. Cependant dans certains cas, l'excrétion débute avant l'épuisement total de thréonine (figure 5.2). En fait, la L-thréonine a été stérilisée à 105°C et on peut supposer qu'à cette température il y a isomérisation d'une partie de cette L-thréonine en D-thréonine. Dans la culture, il y a consommation de la L-thréonine. Après épuisement de cette L-thréonine, la culture est limitée. Mais il reste dans la culture la D-thréonine qui pourrait être assimilée après isomérisation en L-thréonine.

En conclusion nous constatons donc que nous n'avons pas réussi à obtenir avec ce mutant les résultats annoncés par le brevet. En effet, si les quantités d'homosérine excrétées sont voisines de celles données par le brevet, par contre aucune excrétion de lysine n'a pu être décelée. Les résultats que nous avons donc obtenu avec ce mutant semblent en accord avec ceux obtenus avec le mutant 15592 T11. Nous avons bien obtenu l'excrétion d'homosérine attendue mais nous n'avons jamais trouvé de lysine. La société Kyowa a déposé en 1970, un autre brevet (19) décrivant l'excrétion par ce même mutant d'un dipeptide L-homoséryl-L-lysine. Des hydrolyses des milieux de culture suivies d'analyses d'aminoacides n'ont, jusqu'à présent, donné aucun résultat.

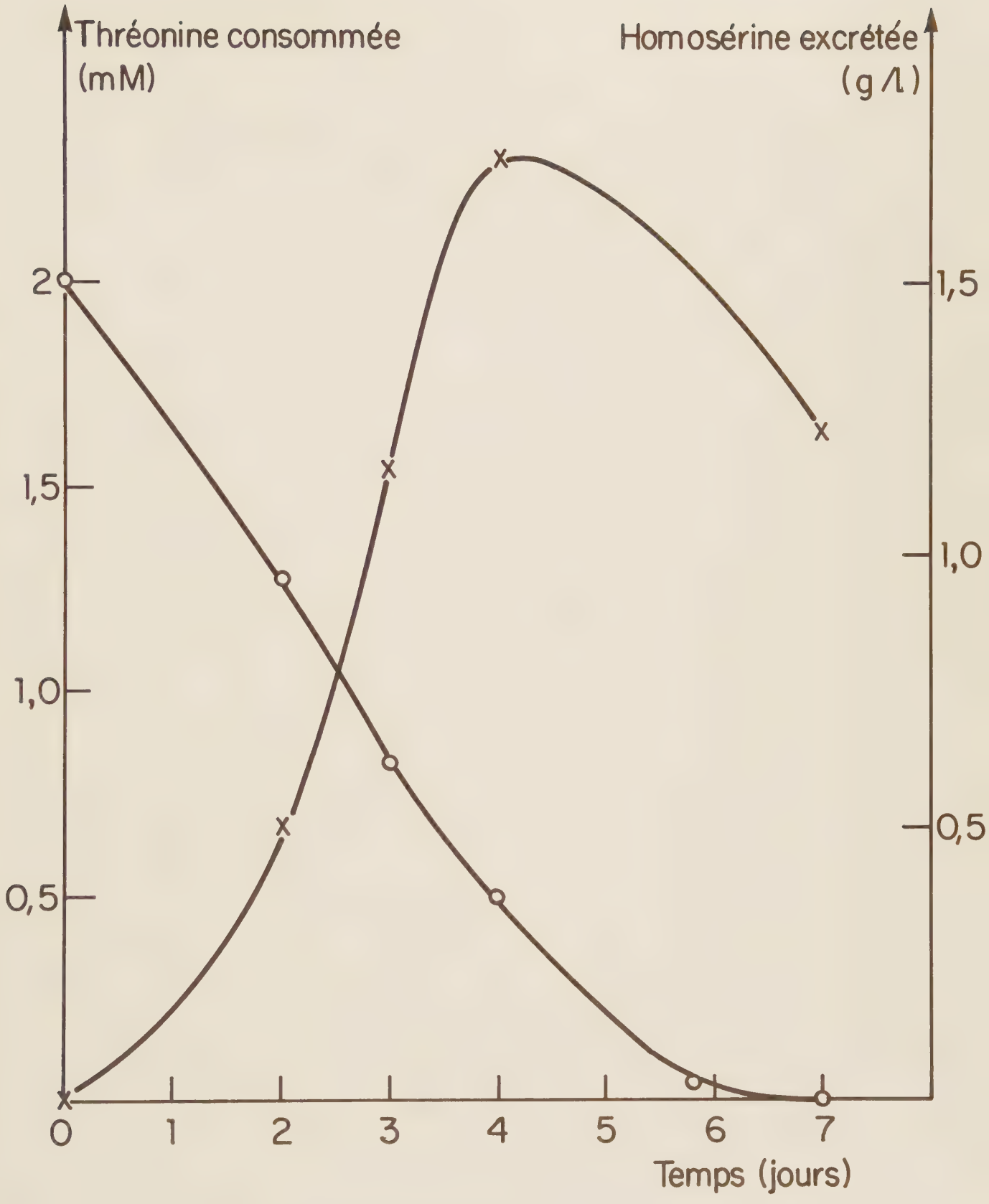


Fig. 5-2. CULTURE DE 15 592 T11 :
—X— EXCRETION D'HOMOSERINE
—O— CONSOMMATION DE THREONINE

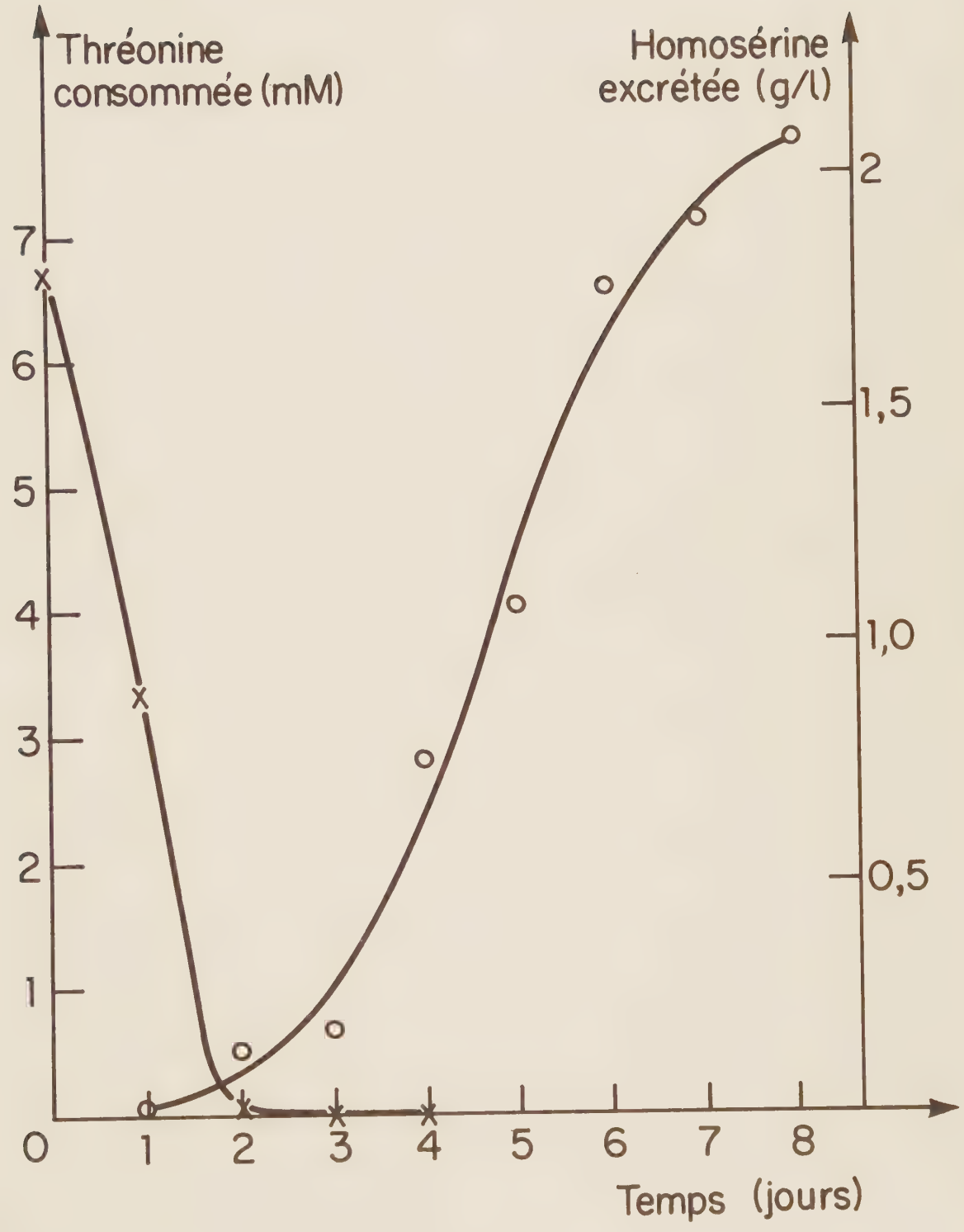


Fig. 5-3. CULTURE DE ATCC 21 267 :
—O— EXCRETION D'HOMOSERINE
—X— CONSOMMATION DE THREONINE

CONCLUSION :

Les résultats obtenus avec les mutants auxotrophes exigeants en thréonine et exigeants en homosérine sont encourageants. Si les mutants thréonine moins n'excrétent pas de lysine, ils excrétent en effet des quantités conséquentes d'homosérine. On ne peut donner à priori d'explication satisfaisante à cette excrétion unique d'homosérine. En effet, le mutant homosérine moins de la souche A2O excrète lui, de la lysine que l'on peut doser dans le milieu de culture. Il est vrai que ce mutant excrète en plus de la lysine, de l'acide diaminopimélique ainsi qu'un produit non identifié donnant de la lysine par hydrolyse acide. Ce produit pourrait être par exemple un intermédiaire de la biosynthèse de la lysine (comme c'est le cas de l'acide diaminopimélique) ou un peptide. On a en effet vu un exemple d'excrétion de dipeptide (L-homoseryl-L-Lysine) (19) par un mutant exigeant en thréonine. L'excrétion de DAP nous a conduit à tenter de mesurer la DAP décarboxylase de ces souches. Nous avons utilisé la méthode colométrique de mesure du DAP (15) mais nous n'avons trouvé aucune activité, même dans des extraits enzymatiques frais obtenus à partir de cellules récoltées en phase exponentielle.

Les quantités de lysine excrétées par A2OH5 peuvent sembler faibles. En réalité, une optimisation de la culture de ce mutant en fermenteur pourrait considérablement augmenter cette excrétion. Cependant, il faut remarquer que ces mutants auxotrophes utilisent des quantités importantes de facteurs de croissance et que d'un point de vue économique leur utilisation risque donc d'être moins "rentable" que les mutants dérégulés étudiés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE VI

OBTENTION ET ETUDE DE MUTANTS DESINHIBES

Parallèlement à l'étude des mutants auxotrophes nous avons essayé d'obtenir des mutants dérégulés à partir des souches de Corynebacterium utilisées et pour cela nous avons étudié l'action des analogues de la lysine sur ces souches. Nous avons vu que l'aspartokinase des trois souches étudiées était d'une part sensible à la rétroinhibition par la thréonine seule et d'autre part sensible à une rétroinhibition concertée par la thréonine plus la lysine. Cette enzyme est la seule enzyme régulée de la chaine de biosynthèse de la lysine. Il est donc prévisible qu'une dérégulation de cette enzyme puisse entraîner chez un mutant de cette sorte une excrétion de lysine. Pour obtenir des mutants dérégulés de l'aspartokinase, nous pouvions soit faire agir sur ces souches des analogues de la lysine et isoler des résistants à ces analogues, soit obtenir des revertants de mutants auxotrophes ayant perdu l'activité de l'aspartokinase, en sélectionnant parmi ces révertants, ceux qui n'ont pas recouvré la sensibilité à la rétroinhibition. Nous avons renoncé à cette dernière méthode devant les difficultés que nous avons eu à obtenir des mutants auxotrophes de Corynebacterium. Nous avons donc étudié l'action des analogues et plus particulièrement de l'amino-éthyl-cystéine sur les souches A20 et C91. Nous avons obtenu des mutants résistants de ces deux souches et nous avons étudié quelques mutants de la souche C91.

6.1. ACTION DES ANALOGUES DE LA LYSINE SUR LES SOUCHES C91 ET A20

Des essais préliminaires ont été effectués sur ces deux souches avec la S (β amino-éthyl) cystéine et la ε.C méthyl-lysine. On étalait sur une boîte de Pétri contenant du milieu R additionné de substrat (glucose pour A20 et acétate pour C91) et éventuellement de thréonine, 1 ml de suspension bactérienne (10^7 à 10^8 bactéries /ml) avec de la gélose molle. On plaçait alors à la surface de la boîte un disque stérile imprégné d'une solution molaire de l'analogue. Toute inhibition de la croissance de la bactérie par l'analogue devait entrainer une auréole claire autour du disque. Dans ces conditions on n'a pas observé d'auréoles autour des disques. L'absence d'inhibition de la croissance des deux souches par chacun des deux analogues déjà cités a été également observé dans des essais identiques effectués avec deux autres analogues : la trans-4 déhydrolysine et le 3-aminocyclohexane alanine sur la croissance de la souche A20.

Les mêmes essais ont été répétés en remplaçant dans le milieu R la source d'azote qui était l'ion ammonium par un nitrate de potassium. Nous avons alors obtenu aussi bien avec l'amino-éthyl-cystéine qu'avec la méthyl-lysine une inhibition de croissance chez ces deux souches. Ces résultats sont illustrés par le tableau 6.1.

TABLEAU 6.1

Action des analogues de la lysine
sur la croissance des souches A20 et C91

Souche	Source d'azote dans le milieu de culture	Analogue	Rayon de l'auréole autour du disque (mm)
A20	NH_4^+	AEC	0
	"	ML	0
	Nitrate	AEC	20
	"	ML	2
C91	NH_4^+	AEC	0
	"	ML	0
	Nitrate	AEC	30
	"	ML	3

AEC = S (β amino-éthyl) cystéine
ML = ε.C méthyl-lysine.

On constate que l'auréole obtenue dans chaque cas avec l'amino-éthyl cystéine est plus grande que celle donnée par la méthyl-lysine. L'inhibition de la croissance par l'amino-éthyl cystéine semble donc plus forte que celle causée par la méthyl lysine et dans la suite de ce travail nous avons utilisé uniquement l'amino-éthyl cystéine.

D'autre part, on remarque l'influence capitale des conditions de culture sur l'inhibition produite par tous les analogues. Ce phénomène sera discuté dans le paragraphe suivant.

6.2. INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR L'ACTION DES ANALOGUES SUR LA CROISSANCE DE LA SOUCHE C91

On a donc constaté que l'action des analogues de la lysine sur la croissance de ces souches était différente selon les conditions de culture. En fait, les analogues de la lysine inhibent la croissance des souches A20 et C91 lorsque la source d'azote du milieu de culture est un nitrate. Ils n'ont aucune action sur la croissance lorsque la source d'azote est un sel d'ammonium. On peut rapprocher ces résultats de deux autres observations signalées précédemment. La première concerne l'action des acides aminés sur la croissance de la souche C91 (p. 36). L'inhibition de la croissance par la thréonine ou l'association lysine plus thréonine ainsi que l'activation par la lysine, la méthionine, l'association méthionine plus thréonine ou méthionine plus thréonine plus lysine n'est en effet observable que lorsque la source d'azote du milieu de culture est un nitrate. Lorsque cette source d'azote est un sel d'ammonium, on n'observe aucun effet sur la croissance. Enfin, la deuxième observation concerne la L-aminoacide oxydase. Cette L-aminoacide oxydase est induite par la lysine

ainsi que par d'autres acides aminés. Cependant, même en présence de lysine elle n'est que peu induite lorsque la culture est effectuée en présence de sels d'ammonium. Lorsque le sulfate d'ammonium est remplacé par un nitrate de potassium l'activité de la L-aminoacide oxydase obtenue est plus importante mais bien inférieure à celle obtenue lorsque la lysine est seule source d'azote (Tableau 4.2, p.41).

On pourrait pour chaque fait trouver une explication. En particulier, on pourrait parler de répression de l'oxydase par les ions ammonium. Cependant dans les trois cas il s'agit de l'action d'un acide aminé ou d'un analogue d'acide aminé sur la croissance ou sur l'induction d'une enzyme de la souche C91. On pourrait donc supposer qu'il existe chez cette souche (ainsi que chez les autres Corynebacterium étudiés) une L-aminoacide perméase fonctionnant pour les acides aminés en général ainsi que pour certains analogues d'acides aminés. Cette perméase serait inhibée lorsque le milieu de culture contient des ions ammonium. Cette inhibition par les ions ammonium expliquerait chez ces souches la résistance aux analogues, l'insensibilité à la lysine, thréonine et méthionine pendant la croissance ainsi que la non induction de la L-aminoacide oxydase. Une telle aminoacide perméase générale inhibée par la présence d'ions ammonium a été décrite par Grenson et coll. chez Saccharomyces cerevisiae (103).

Cependant, un article récent de Calhoun et Jensen (119) décrit chez Pseudomonas aeruginosa l'action de certains analogues des acides aminés aromatiques selon les sources de carbone utilisées. Dans ce cas l'inhibition de la croissance par les analogues dépendait du substrat : elle était d'autant plus forte que le substrat était plus difficilement assimilable et donc la croissance lente. Cela nous a conduit à étudier l'action de l'amino-éthyl cystéine sur la croissance de la souche C91 en utilisant différentes sources de carbone. Les résultats sont donnés dans le tableau 6.2.

TABLEAU 6.2

Action de la S (β amino éthyl) cystéine sur la croissance de la souche C91

Source d'azote	Source de carbone	Diamètre de l'auréole au bout de 2 jours (mm)	Colonies isolées résistantes au bout de 5 jours
NH_4^+	Fructose	35	+++
	Acétate	0	
	Succinate	0	
	Glucose	> 100	+ (*)
Nitrate	Fructose	57	++
	Acétate	50	+
	Succinate	30	-
	Glucose	> 100	-

(*) Le cas du glucose est particulier car ce sucre n'est normalement pas un substrat de la souche C91. Cependant si on ensemence de la façon décrite plus haut (voir 6.1) une suspension de cette souche sur une boite de Pétri contenant le glucose comme source de carbone, il apparaît des mutants qui utilisent ce substrat et forment un grand nombre de colonies isolées. Dans le cas présent, les colonies obtenues sur glucose en présence d'analogue sont donc des mutants capables de pousser sur glucose et résistants à cet analogue.

Ces résultats sont obtenus à partir de boites de Pétri sur lesquelles on a étalé une suspension de cellules de C91 dans la gélose molle et sur lesquelles on a déposé un disque stérile imprégné d'une solution molaire de S (βamino-éthyl) cystéine.

L'examen du tableau 6.2 permet de constater que la résistance à l'amino-éthyl cystéine dépend non seulement de la source d'azote présente dans le milieu mais aussi du substrat de croissance. Ainsi l'explication de ces phénomènes par une L-aminoacide perméase inhibée par les ions ammonium ne semble pas suffisante. Le problème apparaît comme plus complexe. La nature du substrat de la souche pourrait être aussi un facteur important. La souche poussant rapidement sur un substrat (acétate, succinate) est résistante aux analogues en présence de sels d'ammonium, alors qu'elle est sensible aux analogues dans les mêmes conditions lorsque le substrat est le fructose. La vitesse de croissance est peut être aussi un facteur important dans les résultats concernant uniquement les sources d'azote. En effet, on sait que la croissance en présence de sels d'ammonium est plus rapide qu'en présence de nitrate.

Nous pouvons dire, en conclusion, qu'une étude directe de la perméabilité des cellules ayant poussé sur des milieux contenant différentes sources de carbone et d'azote et notamment des essais de mise en évidence d'une éventuelle aminoacide perméase générale serait nécessaire pour sortir du domaine des hypothèses en ce qui concerne les causes des phénomènes observés ici.

6.3. ETUDE DE MUTANTS DE C91 RESISTANTS A LA S (β AMINO-ETHYL) CYSTEINE

6.3.1. OBTENTION DE MUTANTS DE C91 RESISTANTS A LA S (β AMINO-ETHYL) CYSTEINE

Les mutants étaient obtenus par la méthode décrite p.22 . On a isolé des mutants résistants à différentes concentrations d'amino-éthyl cystéine comprises entre 10 mM et 100 mM. De plus on a aussi isolé des mutants résistants à l'association thréonine plus amino-éthyl cystéine et thréonine plus méthionine plus amino-éthyl cystéine. Tous ces mutants étaient repiqués sur tubes de milieu gélosé additionné de l'analogue et des acides aminés qui avaient servi à les isoler.

6.3.2. DETERMINATION QUALITATIVE DE L'EXCRETION DE LYSINE PAR CES MUTANTS

On a testé l'excrétion de lysine par ces mutants en faisant des répliques sur des boites de Pétri où l'on avait étalé la bactérie indicatrice de lysine EC432. Nous avons procédé de deux façons différentes : soit en mettant dans la boite deux substrats (glucose nécessaire à E. Coli et acétate nécessaire à C91), soit en utilisant un seul substrat commun aux deux souches : le fructose. En fait aucune des deux méthodes n'est vraiment satisfaisante. En effet, rien ne prouve que les mutants, s'ils excrètent, excrèteront de la même façon sur tous les substrats et en particulier sur fructose, sur acétate et sur hexadécane. Cependant, il semblait utile d'essayer de cribler les nombreux mutants isolés afin de sélectionner ceux qui semblaient excréter le plus. En réalité, les

résultats obtenus n'ont pas été très positifs. Sur aucune boite nous n'avons eu une auréole nette indiquant nettement une excrétion de lysine. Cependant, nous avons malgré tout sélectionné quatre mutants donnant une très légère auréole. Sur ces quatre mutants nous avons fait une étude enzymatique et effectué des cultures en fioles de Fernbach pour vérifier s'il y avait ou non réellement excrétion de lysine. Ces quatre mutants avaient été isolés sur milieu R où la source d'azote était le nitrate de potassium (2 g/l) additionné d'acétate 50 mM, de thréonine 1 mM, de méthionine 1 mM et d'amino-éthyl cystéine 10 mM pour C91 MAT 32, 50 mM pour C91 MAT 45 et C91 MAT 48 et 100 mM pour C91 MAT 52.

6.3.3. ETUDE DE L'ASPARTOKINASE DE QUATRE MUTANTS DE C91 RESISTANTS A LA S (β AMINO-ETHYL) CYSTEINE

Ces mutants ont été cultivés sur milieu R additionné d'acétate 50 mM. Les extraits étaient obtenus en utilisant la méthode décrite pour la souche sauvage (p. 27). Sur ces extraits on a mesuré l'activité de l'aspartokinase ainsi que la sensibilité de cette enzyme à la rétroinhibition par la thréonine et par la lysine plus thréonine. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 6.3.

TABLEAU 6.3

Mesure de l'activité et de l'inhibition par la lysine et la thréonine de l'aspartokinase de la souche sauvage de C91 et des mutants de C91 résistants à l'amino-éthyl cystéine, la thréonine et la méthionine

Addition	C91	C91 MAT 32	C91 MAT 45	C91 MAT 48	C91 MAT 52
-	100 (1)	100 (2)	100 (3)	100 (4)	100 (5)
Thr 0,2 mM	78,5	63	81	87	
Thr 1 mM	31	4	19	47	105
Thr 5 mM	9,5				96
Thr 50 mM					81
Lys 1 mM + Thr 0,1 mM	60,5	64	81	81	
Lys 1 mM + Thr 0,5 mM	4	0	3	15,5	100
Lys 10 mM + Thr 10 mM					69
Lys 20 mM + Thr 20 mM					27

Les activités spécifiques (nanomoles x min^{-1} x mg^{-1} protéine) des extraits étaient les suivantes :

(1) C91 9,2
(2) C91 MAT 32 ... 8,9
(3) C91 MAT 45 ... 8,1
(4) C91 MAT 48 ... 7,7
(5) C91 MAT 52 ... 8,7

On constate que les mutants C91 MAT 32, C91 MAT 45 et C91 MAT 48 ont une aspartokinase semblable à celle de la souche sauvage C91. Par contre, le mutant C91 MAT 52, qui a été obtenu avec la plus forte concentration d'amino-éthyl cystéine utilisée, s'il a une activité aspartokinase comparable à celle de la souche sauvage, est désensibilisé quant à la rétroinhibition d'une part, par la thréonine seule et d'autre part, par l'action concertée de la thréonine plus la lysine. Le facteur de désensibilisation de ce mutant est environ de 250 en ce qui concerne l'inhibition par la thréonine seule (Figure 6.1).

6.3.4. DETERMINATIONS QUANTITATIVES DE L'EXCRETION DE LYSINE PAR DES MUTANTS RESISTANTS A L'AEC, ET EN PARTICULIER PAR C91 MAT 52

Nous avons cultivé plusieurs mutants de C91 résistants à l'AEC en fioles de Fernbach sur du milieu J ou R additionné d'hexadécane 5 % et de $CaCO_3$ 2 %. Le pH de la culture était réajusté à 6,8 tous les jours. Sept mutants dont quatre résistants à la thréonine plus l'amino-éthyl cystéine et trois résistants à la thréonine plus la méthionine plus l'amino-éthyl cystéine ont été testés de cette façon. Chez aucun d'entre eux, nous n'avons décelé d'excrétion de lysine. Chez trois d'entre eux (C91 MAT 32, C91 MAT 45, C91 MAT 48 nous avons montré que l'aspartokinase est normale et sensible à la rétroinhibition par la thréonine et par la thréonine plus la lysine, ce qui effectivement nous permettait de prévoir que ces mutants n'excrèteraient pas de lysine, leur résistance à l'analogue pouvant provenir d'une mutation à un autre niveau.

Le mutant C91 MAT 52 ainsi que nous l'avons vu est un mutant désinhibé de l'aspartokinase, c'est-à-dire un mutant du type recherché susceptible d'excréter de la lysine. L'excrétion éventuelle de ce mutant a été déterminée en fioles de Fernbach sur milieu J additionné de $CaCO_3$ 2 % et soit d'hexadécane 5 % soit d'acétate 50 mM. On ramenait le pH à 6,8 tous les jours dans le premier cas par de l'ammoniaque N, et dans le second cas par de l'acide acétique 2 N. Des prises d'essai ont été effectuées dans les deux fioles au cours de la croissance et traitées selon la méthode indiquée p.19 . Les acides aminés contenus dans ces prises ont été mesurés d'une part par chromatographie avec un analyseur d'acides aminés et d'autre part par dosage colorimétrique pour la lysine. Le dosage colorimétrique a indiqué une excrétion de lysine aussi bien sur hexadécane (130 mg/l au bout de 6 jours) que sur acétate (120 mg/l au bout de 5 jours). Cependant le dosage par analyseur d'acides aminés nous a montré qu'en réalité la quantité de lysine excrétée était inférieure de moitié à celle déterminée par le dosage colorimétrique. Par contre, ce dosage indiquait, en plus de la lysine une excrétion d'acide diaminopimélique,(360 mg/l), d'acide α-aminoadipique (provenant vraisemblablement de la dégradation de la lysine dans une fiole où l'ion ammonium avait été consommé et n'était plus en excès) et d'un produit non identifié identique à celui excrété par le mutant exigeant en homosérine A2OH5. Ces deux essais préliminaires ont donné des résultats similaires quel que soit le substrat, hexadécane ou acétate.

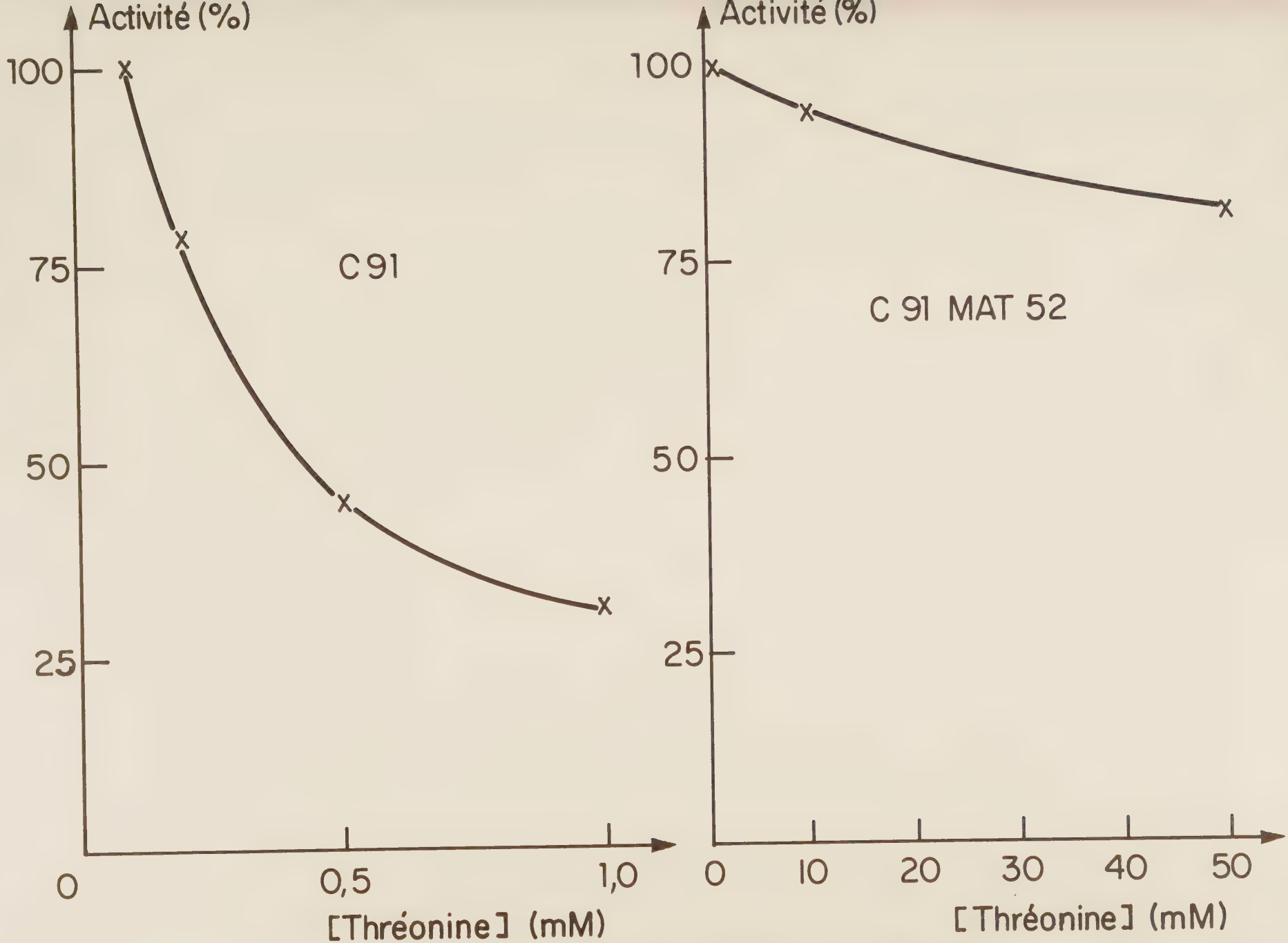


Fig. 6-1. RETROINHIBITION DE L'ASPARTOKINASE PAR LA THREONINE.
COMPARAISON ENTRE LA SOUCHE C 91 ET LE MUTANT C 91MAT52.

CONCLUSION

En conclusion, nous pouvons tirer de ce chapitre deux résultats importants. Le premier concerne l'action des analogues sur la croissance des souches de Corynebacterium étudiées. On a montré que dans certaines conditions ces souches étaient sensibles à l'action des analogues de la lysine et en particulier à la S (β-amino-éthyl) cystéine. Il est donc possible d'isoler par une méthode simple autant de mutants que l'on désire. Le deuxième résultat concerne l'origine de cette résistance à la S (β-amino-éthyl) cystéine chez les mutants obtenus. Si cette origine n'a pas été déterminée dans beaucoup de cas, on a tout de même montré avec le mutant C91 MAT 52 qu'un certain nombre de mutants étaient résistants par suite de la désinhibition de l'aspartokinase. Les quantités de lysine excrétées sont faibles mais, les résultats donnés ici sont préliminaires. Il resterait en fait d'une part à optimiser les conditions de culture de ce mutant et d'autre part à obtenir et tester systématiquement un grand nombre de mutants.

CONCLUSION

Le but poursuivi dans cette thèse était de définir par l'étude de la biosynthèse de la lysine et éventuellement de sa dégradation les types de mutants excréteurs de lysine qu'il paraissait possible d'obtenir chez les souches de Corynebacterium étudiées, puis d'essayer d'obtenir les mutants désirés et de mettre en évidence leur excrétion de lysine.

L'étude de la biosynthèse de la lysine chez ces trois souches nous a en fait permis de confirmer et d'étendre les données de la littérature à ce sujet. Ainsi, nous avons vu que la seule enzyme régulée par rétroinhibition dans la chaine de biosynthèse de la lysine est l'aspartokinase qui est sensible soit à la thréonine seule, soit à l'action concertée de la thréonine plus la lysine. La dihydrodipicolinate synthétase est insensible à la rétroinhibition par la lysine ou par l'acide diaminopimélique. Nous avons aussi vérifié que l'aspartate semi-aldéhyde déshydrogénase était insensible à l'action simple ou conjuguée de la thréonine et de la lysine. Des essais préliminaires concernant une éventuelle régulation de la biosynthèse de la lysine au niveau de l'acide diaminopimélique décarboxylase signalé chez d'autres espèces bactériennes n'ont pas abouti par suite des difficultés de mise en évidence de cette activité enzymatique chez les souches étudiées.

Nous n'avons pas non plus fait d'étude de la répression chez ces souches, ce travail ayant été centré sur l'étude du rôle capital tenu par la rétroinhibition dans la régulation des biosynthèses. Il semble que l'enzyme importante de cette biosynthèse de la lysine soit l'aspartokinase, seule enzyme régulée par rétroinhibition. Ce résultat nous a permis de prévoir que la lysine pourrait être excrétée par deux types de mutants : des mutants auxotrophes exigeants en homosérine ou en thréonine et des mutants ayant une aspartokinase désensibilisée pour la rétroinhibition par la thréonine et la lysine.

Le deuxième point important concernant l'utilisation de ces souches de Corynebactérium pour l'obtention de mutants excréteurs de lysine concernait l'éventuelle dégradation de cette lysine. Nous avons mis en évidence chez ces souches l'existence d'une L-aminoacide oxydase dégradant la lysine ainsi d'ailleurs que la plupart des L-acides aminés. Certaines des propriétés de cette enzyme dont la présence chez les bactéries était peu connue, ont été étudiées.

Comme nous l'avons déjà vu, plusieurs éléments , notamment l'inductibilité par les aminoacides et la répression par les ions ammonium de cette enzyme, ainsi que le fait de l'utilisation de la lysine par ces souches comme source d'azote et non comme source de carbone, indiquent pour la L-aminoacide oxydase un rôle de source d'ions ammonium à partir des L-aminoacides. Cependant puisque cette L-aminoacide oxydase n'est pas synthétisée en présence d'une autre source d'azote assimilable, notamment en présence de sels d'ammonium, il est donc possible d'éviter la dégradation de la lysine par cette enzyme en effectuant les cultures sur un milieu contenant un sel d'ammonium en excès. Cette L-aminoacide oxydase ne semblait donc pas constituer un obstacle à l'excrétion de lysine par des mutants de Corynebactérium.

Nous avons obtenu deux sortes de mutants excréteurs de lysine. D'abord des mutants auxotrophes exigeants en homosérine ou en thréonine, ensuite des mutants de régulation dont l'aspartokinase est insensible à la rétroinhibition par la thréonine et par la lysine plus thréonine. L'obtention de ces derniers s'est heurtée à l'absence d'inhibition de la croissance des souches utilisées par les analogues. Cependant, nous avons mis en évidence qu'une modification du milieu de culture pouvait changer complétement la sensibilité des souches aux analogues et donc permettre d'obtenir des mutants résistants. Nous avons montré que nous avions une excrétion de lysine chez ces deux sortes de mutants.

Mais ces mutants aussi bien auxotrophes que mutants de régulation n'excrétent pas que de la lysine. On a vu qu'il y avait aussi excrétion d'acide diaminopimélique et de deux produits non identifiés. Une excrétion d'acide diaminopimélique a déjà été décrite chez des mutants exigeants en lysine de E.Coli (128) (129) de Brévibacterium ammoniagenes(121) et de souches similaires telles que Corynebactéries et Arthrobacter (122). Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à la nature du produit excrété et non identifié. Il pourrait s'agir d'un peptide; une telle excrétion d'un dipeptide, le L-homoseryl-L-lysine a été décrite dans un brevet (19) concernant le mutant exigeant en thréonine ATCC 21267 que nous avons nous-mêmes succinctement étudié ici. Cependant, un certain nombre de faits, tels que l'excrétion d'acide diaminopimélique et l'interférence de ces produits non identifiés dans le dosage spécifique de la lysine, donnent à penser qu'il pourrait s'agir d'intermédiaires de la biosynthèse de la lysine. L'excrétion d'un de ces intermédiaires, le N-succinyl-L-diaminopimélate a été décrite chez des mutants exigeants en diaminopimélate d'Aerobacter aerogenes et de Serratia marcescens (120).

Quoi qu'il en soit,on peut remarquer que ces multiples excrétions ne sont pas caractéristiques d'un mutant obtenu mais des souches elles-mêmes puisqu'il semble que l'on obtienne les mêmes résultats avec des mutants aussi différents qu'un auxotrophe exigeant en homosérine et un mutant de régulation. En fait, à part cette similitude de résultats, il apparaît très vite que les mutants auxotrophes et les mutants de régulation n'auront pas les mêmes applications. D'abord, les mutants auxotrophes des souches étudiées semblent particulièrement difficiles à obtenir. Il paraît donc qu'obtenir beaucoup de ces mutants demanderait un travail considérable. De plus, il faut ajouter aux milieux de culture des facteurs de croissance, ce qui, du point de vue rentabilité peut être moins intéressant que les mutants de régulation qui, eux, ne nécessitent aucun facteur de croissance. Au contraire, les mutants de régulation, qui sont des résistants à un analogue de la lysine comme la S (β-aminoéthyl) cystéine par exemple, s'obtiennent extrêmement facilement lorsqu'on connaît les conditions d'action de l'analogue. Il est donc envisageable d'en tester de très nombreux afin de sélectionner les meilleurs excréteurs. Il serait même possible de tester des doubles mutants auxotrophes et de régulation obtenus en faisant agir l'analogue sur les mutants auxotrophes. Diverses souches de Corynebacterium ont été utilisées depuis très longtemps pour obtenir des mutants excréteurs de lysine, en particulier, par plusieurs sociétés japonaises. Les premiers travaux utilisaient des souches assimilant les hydrates de carbone (mélasses) et les brevets correspondants ont été déposés. Ces brevets concernaient d'abord des mutants auxotrophes, mais plus récemment ont été étendus

aux mutants résistants aux analogues et même à des mutants auxotrophes résistants aux analogues. Depuis quelques années, les mêmes sociétés japonaises travaillent avec des souches de Corynebactérium assimilant les hydrocarbures. La société KYOWA a déposé en 1967 un brevet concernant des mutants auxotrophes exigeants en homosérine de diverses souches et notamment de Corynebactérium hydrocarboclastus (123). Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans le présent travail avec le mutant A2OH5.

La même société KYOWA a décrit plus récemment et de façon nettement plus détaillée dans deux brevets (61) et (19) l'excrétion d'homosérine et de lysine par le mutant exigeant en thréonine ATCC 21267 que nous avons nous-mêmes utilisé. On remarquera cependant que, contrairement aux indications de ces brevets, on n'a pas pu obtenir d'excrétion de lysine par ce mutant et d'une façon générale par les mutants exigeants en thréonine. Par contre l'excrétion d'homosérine par ces mutants a été confirmée.

De toute façon comme on l'a indiqué dans l'introduction bibliographique l'utilisation de mutants auxotrophes ne présente pas d'originalité réelle pour l'application qui nous occupe mais, le cas des mutants résistants aux analogues de la lysine est à cet égard tout différent.

Ces mutants, faciles à obtenir lorsque les conditions d'utilisation des analogues sont définies présenteront un intérêt certain au point de vue fabrication de lysine. La multiplicité des produits obtenus reste cependant un obstacle dont l'origine n'a pas été déterminée, mais qui pourrait peut être être surmonté par une optimisation des cultures, en particulier de la composition des milieux de culture dont on a déjà constaté l'importance dans cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

1 - P. DATTA et H. GEST
Nature, 203, (1964), 1259.

2 - P. DATTA
Science, 165, (1969), 556.

3 - G.N. COHEN, R.Y. STANIER et G. LE BRAS
J. Bacteriol. 99, n° 3, (1969), 791.

3 bis - G.N. COHEN
"Currents topics in cellular regulation" eds B.L. Horecker et E.R. Stadtman, Academic Press, New-York and London, Vol. 1, (1969), 183.

4 - E.R. STADTMAN, G.N. COHEN, G. LE BRAS et H. DE ROBICHON-SZULMAJSTER
J. Biol. Chem. 236, (1961), 2033.

5 - M. ROBERT-GERO, M. POIRET, G.N. COHEN
Biochim. Biophys. Acta 206, (1970), 17.

6 - P. DATTA et H. GEST
Biochem., 52, (1964), 1004.

7 - P. DATTA et L. PRAKASH
J. Biol. Chem., 241, n° 24, (1966), 5827.

8 - H. PAULUS et E. GRAY
J. Biol. Chem., 239, (1964), 4008.

9 - D.P. STAHLY et R.W. BERNLOHR
Biochim. Biophys. Acta, 146, (1967), 467.

10 - B.H. GRAY et R.W. BERNLOHR
Biochim. Biophys. Acta, 178, (1969), 248.

11 - B.Z. CAVARI, H. ARKIN-SHLANK et N. GROSSOWICZ
Biochim. Biophys. Acta, 261, (1972), 161.

12 - H.K. KURAMITSU
J. Biol. Chem., 245, (1970), 2991.

13 - A. ROSNER et H. PAULUS
J. Biol. Chem., 246, (1971), 2965.

14 - H.K. KURAMITSU et S. YOSHIMURA
Arch. Biochem. Biophys., 147, (1971), 683.

15 - P.J. WHITE
"Methods in enzymology" eds S.P. Colowick et N.O. Kaplan, Academic Press, New-York and London, Vol. XVII b, (1971), 140.

16 - K. NAKAYAMA, H. TANAKA, H. HAGINO et S. KINOSHITA
Agr. Biol. Chem., (TOKYO), 30, (1966), 611.

17 - I. SHIIO et R. MIYAJIMA
J. Biochem., (TOKYO), 65, (1969), 849.

18 - M. HERMANN
Thèse de doctorat es-Sciences, PARIS, 1972.

19 - Brevet français 2.047.755 (C 12 d 13/00),
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD, 14 mai 1970, appl. 1er mars 1971.

20 - R. MIYAJAMA, S. OTSUKA et I. SHIIO
J. Biochem. (TOKYO), 63, (1968), 139.

21 - M. ROBERT-GERO, M. POIRET, G.N. COHEN
Biochem. Biophys. Acta, 206, (1970), 31.

22 - E. STURANI, P. DATTA, M. HUGHES, H. GEST
Science, 141, (1963), 1053.

23 - R. MIYAJIMA et I. SHIIO
J. Biochem. (TOKYO), 68, (1970), 311.

24 - K. BURTON
Biochem. J., 50, (1951), 258.

25 - J.C. PATTE, G. LE BRAS et G.N. COHEN
Biochim. Biophys. Acta, 136, (1967), 245.

26 - J.C. PATTE, P. TRUFFA-BACHI et G.N. COHEN
Biochim. Biophys. Acta, 128, (1966), 426.

27 - J.G. SHEDLARSKY et C. GILVARG
J. Biol. Chem., 245, (1970), 1362.

28 - I.J. BARNES, A. BONDI, A.G. MOAT
J. Bacteriol., 99, (1969), 169.

29 - R. MIYAJIMA et I. SHIIO
Agr. Biol. Chem. (TOKYO), 34, (1970), 1275.

30 - D.P. STAHLY
Biochem, Biophys. Acta, 191, (1969), 439.

31 - F.H WEBSTER et R.V. LECHOWITCH
J. Bacteriol., 101, (1970), 118.

32 - L.A. CHASIN et J. SZULMAJSTER
Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, (1967), 648.

33 - D.P. GILBOE, J.D. FRIEDE, L.M. HENDERSON
J. Bacteriol., 95, (1968), 856.

34 - P. TRUFFA-BACHI, J.C. PATTE et G.N. COHEN
Comptes rendus, 265, (1967), 928.

35 - V.W. RODWELL
in "Metabolic pathways" Vol. III, eds Academic Press, New-York and London, (1969), 217.

36 - E.F. GALE et H.M.R. EPPS
Nature, 152, (1943), 327.

37 - E.F. GALE et H.M.R. EPPS
Biochem. J., 38, (1944), 232.

38 - H. TAKEDA et O. HAYAISHI
J. Biol. Chem., 241, (1966), 2733.

39 - H. TAKEDA, S. YAMAMOTO, Y. KOJIMA et O. HAYAISHI
J. Biol. Chem., 244, (1969), 2935.

40 - M.S. REITZ et V.W. RODWELL
J. Biol. Chem., 245, (1970), 3091.

41 - A. ICHIHARA , E.A.ICHIHARA et M. SUDA
J. Biochem. (TOKYO), 48, (1960), 412.

42 - S. NUMA, Y. ISHIMURA, T. NAKAZAWA, T. OKAZAKI et O. HAYAISHI
J. Biol. Chem., 239, (1964), 3915.

43 - D.L. MILLER et V.W. RODWELL
J. Biol. Chem., 246, (1971), 2758.

44 - H.J. SALLACH et L.A. FAHIEN
"Metabolic pathways", D.M. Greenberg ed., Vol. III, Academic Press, New-York, (1969), 36.

45 - H.A. KREBS
"The Enzymes", J.B. Sumner et K. Myrbäck eds, Vol. II, Part. I, Acad. Press, New-York, (1951), 514.

46 - A. MEISTER
"Biochemistry of the amino acids", 2e ed., Vol. I, Acad. Press, New-York, 304.

47 - D. WELLNER et A. MEISTER
J. Biol. Chem., 235, (1960), 2013.

48 - D. WELLNER et A. MEISTER
J. Biol. Chem., 236, (1961), 2357.

49 - E.A. ZELLER et A. MARITZ
Helv. Chim. Acta, 27, (1944), 1888.

50 - E.A. ZELLER et A. MARITZ
Helv. Chim. Acta, 28 (1945), 365.

51 - T.P. SINGER et E.B. KEARNEY
Arch. Biochem. Biophys., 27, (1950), 348.

52 - T.P. SINGER et E.B. KEARNEY
Arch. Biochem. Biophys., 29, (1950), 190.

53 - A.E. BENDER et H.A. KREBS
Biochem. J., 46, (1950), 210.

54 - A.E. BENDER, H.A. KREBS et N.H. HOROWITZ
Biochem. J., 45, (1949), XXI.

55 - M. BLANCHARD, D.E. GREEN, V. NOCITO et S. RATNER
J. Biol. Chem., 155, (1944), 421.

56 - M. BLANCHARD, D.E. GREEN, V. NOCITO et S. RATNER
J. Biol. Chem., 161, (1945), 583.

57 - P.K. STUMPF, D.E.GREEN
J. Biol. Chem., 153, (1944), 387.

58 - A.J. ROSENBERG et B. NISMAN
Biochem. Biophys. Acta, 3, (1949), 348.

59 - V.S. KRISHNAMURTHI, P.J. BUCKLEY, J.A. DUERRE
Arch. Biochem. Biophys., 130, (1969), 636.

60 - S.S. CHEN, J.H. WALGATE et J.A. DUERRE
Arch. Biochem. Biophys., 146, (1971), 54.

61 - Brevet français 1.581.254, (C 12 d), déposé par KYOWA HAKKO KOGYO CO. LTD, 29 août 1968, appl. 4 août 1969.

62 - U.S. Patent 2.978.384, K YAMADA, (1961).

63 - Brevet français 1.426.792 (C 12 d), déposé par KYOWA HAKKO KOGYO CO. LTD, 22 mars 1965, appl. 20 décembre 1965.

64 - Brevet français 1.527.583, déposé par KYOWA HAKKO KOGYO CO. LTD 16 juin 1967, appl. le 22 avril 1968.

65 - Brevet français 1.552.503, déposé par KYOWA HAKKO KOGYO CO. LTD 26 janvier 1968, appl. le 25 novembre 1968.

66 - Brevet français 2.048.898, déposé par AJINOMOTO CO. INC. et SANRAKU OCEAN CO. LTD,27 mai 1970, appl. 8 mars 1971.

67 - D.S. ROBINSON
Antonie Van Leuwenhoek, J. Microbiol. Serol., 30, (1964), 303.

68 - S. BLACK et N. WRIGHT
J. Biol. Chem., 213, (1955), 27.

69 - S. BLACK et N. WRIGHT
J. Biol. Chem., 213, (1955), 51.

70 - Y. YUGARI et C. GILVARG
J. Biol. Chem., 240, (1965), 4710.

71 - W.W. KIELLEY
"Methods in enzymology" eds. S.P. Colowick et N.O. Kaplan, Academic Press, New-York and London, Vol. VI, (1963), 272.

72 - R.W. ESTABROOK
"Methods in enzymology", eds. S.P. Colowick et N.O. Kaplan, academic Press, New-York and London, Vol. X, (1967), 41.

73 - P. ANDREWS
Biochem. J., 96, (1965), 595.

74 - P. ANDREWS
Biochem. J., 91, (1964), 222.

75 - O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL
J. Biol. Chem. 193, (1951), 265.

76 - E. LAYNE
"Methods in enzymology", Colowick et Kaplan eds. Academic Press, New-York, Vol. III, (1957), 450.

77 - H.J. VOGEL et Y. SHIMURA
"Methods in Enzymology", Colowick et Kaplan esd, Academic Press, New-York and London, Vol. XVII, part B, (1971), 228.

78 - L.N. ORNSTON, M.K. ORNSTON et G. CHOU
Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, (1969), 179.

79 - S. BLACK et N. WRIGHT
J. Biol. Chem., 213, (1955), 39.

80 - M. HERMANN, N.J. THEVENET, M.M. COUDERT-MARATIER et J.P. VANDECASTEELE
Eur. J. Biochem., 30, (1972), 100.

81 - J.P. VANDECASTEELE et M. HERMANN
Eur. J. Biochem., 31, (1972), 80.

82 - R.A.J. WARREN, A.F. ELLS et J.J.R. CAMPBELL
J. Bacteriol., 79, (1960), 875.

83 - A.F. GRONLUND et J.J.R. CAMPBELL
J. Bacteriol., 81, (1961), 721.

84 - R.E. STRANGE, F.A. DARK et A.G. NESS
J. Gén. Microbiol., 25, (1961), 61.

85 - H.S. MOYED et E.H. UMBARGER
Physiol. Rev. , 42, (1962), 444.

86 - M. COHN, G.H. COHEN et J. MONOD
Comptes rendus, 236, (1953), 746.

87 - S. WIJESUNDERA et D.D. WOODS
Biochem. J., 55, (1953), VIII.

88 - E.H. UMBARGER
Science, 123, (1956), 848.

89 - R.A. YATES et A.B. PARDEE
J. Biol. Chem., 221, (1956), 757.

90 - T. NARA, H. SAMEJINA, G. FUGITA, M. ITO, K. NAKAYAMA et S. KINOSHITA
Agr. Biol. Chem., 25, (1961), 532.

91 - R. MIYAJIMA et I. SHIIO
Agr. Biol. Chem., 35, (1971), 424.

92 - E.R. STADTMAN
Bacteriol. Rev., 27, (1963), 170.

93 - S. KINOSHITA, K. NAKAYAMA et S. KITADA
J. Gen. Appl. Microbiol., 4, (1958), 128.

94 - K. NAKAYAMA, S. KITADA, Z. SATO, et S. KINOSHITA
J. Gen. Appl. Microbiol., 7, (1961), 41.

95 - K. NAKAYAMA, S. KITADA, et S. KINOSHITA
J. Gen. Appl. Microbiol., 7, (1961), 145.

96 - D.R. DAOUST et T.H. STOUDT
"Developments in industrial Microbiology" ed. American Institute of Biological Sciences, Washington D.C., Vol. 7, (1966), 22.

97 - K.SANO et I. SHIIO
J. Gen. Appl. Microbiol, 13, (1967), 349.

98 - I. SHIIO et R. UCHIO
J. Gen. Appl. Microbiol., 15, (1969), 65.

99 - E.A. ADELBERG
J. Bacteriol., 76, (1958), 326.

100 - G.N. COHEN et E.A. ADELBERG
J. Bacteriol., 76, (1958), 328.

101 - K. SANO et I. SHIIO
J. Gen. Appl. Microbiol., 16, (1970), 373.

102 - L. BURLANT, P. DATTA, et H. GEST
Science, 148, (1965), 1351.

103 - M. GRENSON, C. HOU et M. CRABEEL
J. Bacteriol., 103, (1970), 770.

104 - P. TRUFFA-BACHI et G.N. COHEN
Biochem. Biophys. Acta, 113, (1966), 531.

105 - P. TRUFFA-BACHI et G.N. COHEN
Ann. Rev. Biochem., 37, (1968), 79.

106 - G.N. COHEN et J.C. PATTE
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, (1963), 513.

107 - Y. NAKAO, H. KIKUCHI, M. SUZUKI et M. DOI
Agr. Biol. Chem., 36, (1972), 490.

108 - A. KORNBERG
"Methods of enzymology" eds S.P. Colowick et N.O. Kaplan, Academic Press, New-York, Vol. I, (1955), 441.

109 - Y.F. CHANG et E. ADAMS
Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, (1971), 570.

110 - K. YAMAGUCHI, T. SUZUKI, K. KIMURA, K. TANAKA et S. KINOSHITA
Amino acid et Nucleic acid, 20, (1969), 57.

111 - H. HAGIHIRA, H. HAYASHI, A. ICHIHARA et M. SUDA
J. Biochem., 48, (1960), 267.

112 - H. IIZUKA et K. KOMAGATA
J. Gen. Appl. Microbiol., 10, (1964), 207.

113 - J.P. TASSIN et J.P. VANDECASTEELE
Biochim. Biophys. Acta, 276, (1972), 31.

114 - B.J.DAVIS
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, (1964), 404.

115 - A.A. GREEN et W.L. HUGHES
"Methods in enzymology" eds. S.P. Colowick et N.O. Kaplan, Academic Press, New-York, Vol. 1, (1955), 67.

116 - B.CHANCE et A.C. MAEHLY
"Methods of enzymology" eds. S.P. colowick et N.O. Kaplan, Academic Press, New-York, Vol. II, (1955), 764.

117 - M.B. HAYES et D. WELLNER
J. Biol. Chem., 244, (1969), 6636.

118 - M. DIXON et E.C. WEBBS
"Enzymes" Eds Longmans - 2nd Edition, (1964), 75.

119 - D.H. CALHOUN et R.A. JENSEN
J. Bacteriol., 109, (1972), 365.

120 - K. NAKAYAMA, H. KASE et S. KINOSHITA
Agr. Biol. Chem., 34, (1970), 282.

121 - H. HAGINO et K. NAKAYAMA
NIPPON NOGEIKAGAKU KAISHI, 44, (1970), 422.

122 - H. KASE et K. NAKAYAMA
NIPPON NOGEIKAGAKU KAISHI, 44, (1970), 457.

123 - Brevet français 1.499.336 (C 12 d) déposé par KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD, le 9 septembre 1966, Appl. 18 septembre 1967.

124 - Brevet français 2.021.688 (C 12 d 13/00) déposé par KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD, le 17 octobre 1969, Appl. 24 juillet 1970.

125 - Brevet français 2.033.119 (C 12 d 13/00) déposé par AJINOMOTO CO., INC. le 26 février 1970, Appl. le 16 novembre 1970.

126 - Brevet français 2.120.633 (C 12 d 13/00//C 12 k 9/00) déposé par KANEGAFUCHI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA le 5 août 1971, Appl. le 24 juillet 1972.

127 - Patent Spécification 1.258.380 (C 07 c 101/24) déposé par AJINOMOTO CO. INC. le 20 mars 1969, Appl. le 3 mars 1970.

128 - D.L.DEWEY et E. WORK.
Nature, 169, (1952), 533

129 - B.D. DAVIS
Nature, 169, (1952), 534

130 - L.BARKSDALE
Bacteriol, Rev. 34, (1970),378

S O M M A I R E

CHAPITRE I — Pages

INTRODUCTION

1.1. Etude bibliographique 1

1.1.1 La biosynthèse de la lysine et sa régulation 1

1.1.2 Dégradation de la lysine 4

1.1.3 Obtention des mutants excréteurs - types de mutants envisageables 5

1.2 Présentation du travail 7

1.2.1 Origine et études préliminaires 7

1.2.2 Définition du sujet et présentation adoptée 7

CHAPITRE II

METHODES EXPERIMENTALES

2.1. Souches 9

2.2. Cultures bactériennes 9

2.3. Préparation des extraits enzymatiques 12

2.4. Mesure des activités enzymatiques 12

2.4.1 Aspartokinase 12

2.4.2 Aspartate semi-aldehyde déshydrogénase 14

2.4.3 Dihydrodipicolinate synthétase 14

2.4.4 Homosérine déshydrogénase 15

2.4.5 L-aminoacide oxydase 15

2.4.6 Catalase 16

Pages

2.5 Techniques de purification et d'étude des protéines 17

2.5.1 Précipitation au sulfate d'ammonium 17

2.5.2 Chromatographie 17

2.5.3 Détermination des poids moléculaires par chromatographie d'exclusion 17

2.5.4 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 18

2.6 Déterminations analytiques 18

2.6.1 Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques 18

2.6.2 Détermination qualitative de l'excrétion de lysine 19

2.6.3 Dosage de la lysine excrétée par des mutants dans les milieux de culture 19

2.6.4 Dosage des acides aminés 20

2.7 Obtention de mutants 20

2.7.1 Mutants auxotrophes 20

2.7.2 Mutants résistants à des analogues d'acides aminés 22

2.8 Produits chimiques 23

CHAPITRE III

ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DE LA LYSINE ET DE SA REGULATION

3.1 Aspartokinase 25

3.1.1 Essais préliminaires 25

3.1.2 Action des ions métalliques et des anions 27

3.1.3 Activité de l'aspartokinase en fonction de la concentration en aspartate 29

3.1.4 Inhibition par la lysine et la thréonine 29

3.1.5 Action d'autres acides aminés 30

3.1.6 Action d'un analogue de la lysine 33

Pages

3.2 Dihydrodipicolinate synthétase 33

3.3 Homosérine déshydrogénase 34

3.3.1 Conditions d'essai 34

3.3.2 Inhibition par les aminoacides 35

3.4 Action de la lysine, méthionine et thréonine sur la croissance de la souche C91 36

CHAPITRE IV

DEGRADATION DE LA LYSINE

LA L-AMINOACIDE OXYDASE DE CORYNEBACTERIUM

4.1 Conditions de culture 39

4.2 Identification 40

4.3 Influence des conditions de culture de la souche 41

4.4 Etude d'une éventuelle relation de l'aminoacide oxydase avec le métabolisme endogène 42

4.5 Stabilité 42

4.6 Spécificité et Inducteurs 43

4.7 Action du pH 44

4.8 Action de la molarité du tampon 44

4.9 Inactivation thermique 44

4.10 Etude cinétique 44

4.10.1 Mesure des Km 46

4.10.2 Inhibition par excès de substrat 46

4.11 Essais de purification de la L-aminoacide oxydase 46

4.12 Estimation de la masse moléculaire de la L-aminoacide oxydase 48

4.13 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 48

4.14 Etude d'autres souches 48

4.15 Conclusion 49

Pages

CHAPITRE V

OBTENTION ET ETUDE DE MUTANTS AUXOTROPHES

5.1 Obtention de mutants auxotrophes 51

5.2 Etude du mutant homosérine moins A2OH5 52

5.2.1 Caractérisation de ce mutant 52

5.2.2 Limitation de la croissance du mutant A2OH5 par la quantité de thréonine dans le milieu de culture 53

5.2.3 Excrétion de lysine par le mutant A2OH5 53

5.3 Etude des mutants exigeants en thréonine 56

5.3.1 Caractérisation de ces mutants 56

5.3.2 Limitation de la croissance des mutants thréonine moins par la quantité de thréonine présente dans le milieu de culture 56

5.3.3 Excrétion de lysine et d'homosérine par les mutants exigeants en thréonine et en particulier avec le mutant 15592 T 11 56

5.3.4 Etude d'un mutant exigeant en thréonine de collection ATCC 21267 57

CHAPITRE VI

OBTENTION ET ETUDE DE MUTANTS DESINHIBES

6.1 Action des analogues de la lysine sur les souches C91 et A2O 61

6.2 Influence des conditions de culture sur l'action des analogues sur la croissance de la souche C91 62

6.3 Etude de mutants de C91 résistants à la S(β-amino-ethyl) cystéine 64

6.3.1 Obtention de mutants de C91 résistants à la S(β-amino-ethyl) cystéine 64

6.3.2 Détermination qualitative de l'excrétion de lysine par ces mutants 64

6.3.3 Etude de l'aspartokinase de quatre mutants de C91 résistants à la S(β-amino-ethyl) cystéine 65

Pages

6.3.4 Déterminations quantitatives de l'excrétion de lysine par des mutants résistants à l'aminoéthyl cystéine, et en particulier par C 91 MAT 52 66

CONCLUSION 69

BIBLIOGRAPHIE 73

SOMMAIRE 81

Je suis extrêmement reconnaissante à l'INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE de m'avoir accordé une bourse d'études et de m'avoir permis de réaliser ce travail. Je remercie particulièrement M. SAJUS et Mme BLOCH dont les encouragements m'ont été précieux.

Je remercie MM. P. LAFFITTE, J.C. PATTE et L. SAJUS d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie également M. J.C. PATTE des conseils, suggestions et critiques dont il m'a fait bénéficier.

Je suis infiniment reconnaissante à M. J.P. VANDECASTEELE pour l'aide qu'il m'a apportée et les conseils qu'il m'a donnés avec patience tout au long de ce travail.

Je remercie également M. MALDONADO pour d'intéressantes discussions concernant divers aspects de ce travail.

Je remercie Mlle LAPEYRONNIE et Mme LEMAL pour le concours qu'elles ont apporté à la réalisation de certaines expériences.

Je remercie enfin tous mes camarades de thèse dont l'aide et le soutien m'ont été très précieux.

Vu et Approuvé

PARIS, le 22 Mai 1973

Le Président

de l'Université de PARIS VI